(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-260773
(P2008-260773A)
(43)公開日　平成20年10月30日(2008.10.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	ZNA	4C084
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4H045
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	105	
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705		

審査請求 有　請求項の数 5　OL　（全 58 頁）

(21)出願番号　特願2008-123043(P2008-123043)
(22)出願日　平成20年5月9日(2008.5.9)
(62)分割の表示　特願平10-549046の分割
原出願日　平成10年5月13日(1998.5.13)
(31)優先権主張番号　特願平9-124064
(32)優先日　平成9年5月14日(1997.5.14)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　000000033
旭化成株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜１丁目２番６号
(74)代理人　110000109
特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者　坂野　誠治
東京都千代田区有楽町一丁目１番２号　旭化成株式会社内

Fターム(参考)　4C084 AA02 BA02 BA08 BA22 CA26 DA27 NA14 ZB262
4H045 AA10 BA10 CA40 DA50 EA24 FA74

(54)【発明の名称】新規な分化抑制剤

(57)【要約】
【課題】新規なノッチリガンド分子の遺伝子配列、アミノ酸配列を明らかにし、この新規ノッチリガンド分子を提供し、この分子を用いた新しい治療方法を提供すること。
【解決手段】配列表の配列番号３に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを含有する、血液未分化細胞のための分化抑制剤。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列表の配列番号３に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを含有する、血液未分化細胞のための分化抑制剤。
【請求項２】
血液未分化細胞が造血幹細胞又は血液前駆細胞である、請求項１に記載の分化抑制剤。
【請求項３】
配列表の配列番号３に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを含有する、血管細胞の増殖抑制剤。
【請求項４】
血管細胞が血管内皮細胞である、請求項３に記載の増殖抑制剤。
【請求項５】
血管内皮細胞が、ヒト大動脈血管内皮細胞またはヒト肺動脈血管内皮細胞である、請求項４に記載の増殖抑制剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、新規生理活性物質に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
ヒトの血液、リンパ液中には多種類の細胞があり、それぞれが重要な役割を担っている。例えば、赤血球は体内での酸素運搬を、血小板は止血作用を、白血球やリンパ球は感染を防御している。これらの多様な細胞は骨髄中の造血幹細胞に由来する。造血幹細胞は体内の種々のサイトカインや環境要因によって刺激されて、各種血液細胞、破骨細胞、肥満細胞などに分化することが近年明らかにされてきた。このサイトカインとして、赤血球への分化についてはエリスロポエチン（ＥＰＯ）が、白血球への分化については顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）が、血小板産生細胞である巨核球への分化については血小板増殖因子（ｍｐｌリガンド）が発見されて、前者２つは現在すでに臨床応用がなされている。
【０００３】
血液未分化細胞に関して、特定の血液系列に分化することが運命づけられた血液前駆細胞とすべての系列への分化能と自己複製能を有する造血幹細胞に概念的に分類されている。血液前駆細胞に関してコロニーアッセイによって同定が可能であるが、造血幹細胞の同定方法は確立されていない。これらの細胞に関して、ステムセルファクター（ＳＣＦ）やインターロイキン３（ＩＬ－３）、顆粒球単球コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、インターロイキン１（ＩＬ－１）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、オンコスタチンＭなどが細胞の分化増殖を促すことが報告されている。
【０００４】
骨髄移植療法に代替される造血幹細胞移植療法や遺伝子治療への応用のため、造血幹細胞を体外で増幅することが検討されている。しかし、この細胞を上記のようなサイトカインを用いて体外で増殖培養させると、造血幹細胞が本来有している多分化能および自己複製能が徐々に失われ、５週間培養後には特定の系列にのみ分化する血液前駆細胞へと変化し、造血幹細胞の特徴の一つである多分化能が失われることが報告されている（Ｗａｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　８６，５１２－５２３，１９９５）。
【０００５】
血液前駆細胞の増殖には単独のサイトカインのみでは効果が十分でなく、複数のサイトカインの共同作用（シナジー）が重要であることが明らかになっている。このことから造血幹細胞の特徴を維持したまま増殖させるためには、血液未分化細胞を増殖、分化させるサイトカインと共に分化を抑制するサイトカインが必要であると考えられている。しかし

、一般に細胞の増殖や分化を促進するサイトカインが多数見いだされているのに対して、細胞の分化を抑制するサイトカインは少数しか見いだされていない。例えば、白血病細胞阻害因子（ＬＩＦ）はマウス胚幹細胞を分化させずに増殖させる作用が報告されているが、造血幹細胞や血液前駆細胞に対し、そのような作用は有していない。また、腫瘍細胞増殖因子（ＴＧＦ－β）は多様な細胞に対して増殖抑制の作用をするが、造血幹細胞や血液前駆細胞に対する作用は一定の見解が得られていない。

【０００６】

血液細胞のみならず、未分化細胞、特に幹細胞に関しては組織再生に強く関与すると考えられている。これらの組織再生、並びに各組織の未分化細胞を増幅させることは成書（吉里勝利著 再生－甦るしくみ、１９９６、羊土社）を参考にすることからその幅広い用途を知ることができる。

【０００７】

ノッチ（Ｎｏｔｃｈ）はショウジョウバエで発見された神経細胞の分化制御に関わるリセプター型膜蛋白質であり、ノッチのホモログは線虫（Ｌｉｎ－１２）、アフリカツメガエル（Ｘｏｔｃｈ）、マウス（Ｍｏｔｃｈ）、ヒト（ＴＡＮ－１）などの無脊椎動物、脊椎動物の分類を越えた広い動物種から見いだされている。一方、ショウジョウバエノッチのリガンドとしてショウジョウバエデルタ（Ｄｅｌｔａ）およびショウジョウバエセレイト（Ｓｅｒｒａｔｅ）の２つが見いだされており、リセプターのノッチと同様に広い動物種からノッチリガンドホモログが見いだされている（Ａｒｔａｖａｎｉｓ－Ｔｓａｋｏｎａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６８，２２５－２３２，１９９５）。

【０００８】

特にヒトに関して、ヒトノッチホモログであるＴＡＮ－１は、幅広く体中の組織に発現されており（Ｅｌｌｉｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ６６，６４９－６６１，１９９１）、またＴＡＮ－１以外に３つのノッチ類縁分子が存在することが報告されている（Ａｒｔａｖａｎｉｓ－Ｔｓａｋｏｎａｓ ｅｔ ａｌ．
，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６８，２２５－２３２，１９９５）。血液細胞においては、ＰＣＲ（Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ）法にてＣＤ３４陽性細胞にＴＡＮ－１の発現が認められている（Ｍｉｌｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ８３，２０５７－２０６２，１９９４）。しかしながらヒトに関して、ノッチのリガンドと考えられるヒトデルタ、ヒトセレイトの遺伝子及びアミノ酸の配列は１９９７年４月時点では学術論文として報告されていない。

【０００９】

ショウジョウバエノッチについて、そのリガンドとの結合性が詳細に調べられ、ノッチの細胞外部分に３６あるＥｐｉｄｅｒｍａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ（ＥＧＦ）様繰り返しアミノ酸配列のうち１１番目と１２番目の繰り返し配列を結合領域として、リガンドとCa^{++}を介して結合し得ることが示された（文献のＦｅｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ６１，５２３－５３４，１９９０およびＲｅｂａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ６７，６８７－６９９，１９９１および国際公開番号ＷＯ９２／１９７３４）。他種のノッチホモログについてもＥＧＦ繰り返し配列は保存されており、リガンドとの結合に関して同様の機構が類推されている。リガンドにおいてもアミノ酸末端の近くにＤＳＬ（Ｄｅｌｔａ－Ｓｅｒｒａｔｅ－Ｌａｇ－２）と呼ばれるアミノ酸配列とリセプターと同様にＥＧＦ様繰り返し配列が保存されている（Ａｒｔａｖａｎｉｓ－Ｔｓａｋｏｎａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６８，２２５－２３２，１９９５）。

【００１０】

一方、ＥＧＦ様配列はトロンボモジュリン（Ｊａｃｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３，８８３４－８８３８，１９８６）や低密度リポ蛋白質（ＬＤＬ）リセプター（Ｒｕｓｓｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ３７，５７７－５８５，１９８４）および血液凝固因子（Ｆｕｒｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ５３，５０５－５１８，１９８８）で見いだされ、細胞外での凝集や接着に重要な役割を果たすと考えられている。

【００１１】
近年クローニングされたショウジョウバエデルタの脊椎動物のホモログはニワトリ（Ｃ－デルター１）とアフリカツメガエル（Ｘ－デルター１）が見いだされており、Ｘ－デルター１は原始ニューロンの発生にＸｏｔｃｈを介して作用することが報告されている（Ｈｅｎｒｉｑｕｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３７５，７８７－７９０，１９９５およびＣｈｉｔｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３７５，７６１－７６６，１９９５）。一方、ショウジョウバエセレイトの脊椎動物のホモログは、ラットジャグド（Ｊａｇｇｅｄ）が見いだされている（Ｌｉｎｄｓｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ８０，９０９－９１７，１９９５）。この報告によれば、ラットジャグドのｍＲＮＡは胎仔ラットの脊髄に検出される。また、ラットノッチを強制的に過剰発現させた筋芽細胞株とラットジャグド発現細胞株の共培養により、この筋芽細胞株の分化が抑制されることが見いだされているが、ラットノッチを強制発現させていない筋芽細胞株に対してはラットジャグドが作用しないことが見いだされている。
【００１２】
本発明者はノッチおよびそのリガンドが神経芽細胞、筋芽細胞の分化制御のみならず、広く未分化な細胞、特に血液未分化細胞の分化制御を行なうとの仮説を立てた。しかしヒトへ臨床応用する際、既知のニワトリ型、アフリカツメガエル型などの異種の生物種のノッチリガンドでは種特異性、抗原性の問題がある。このため未だ報告のないヒト型のノッチリガンドを取得することは不可欠である。
【００１３】
そこで、本発明者はノッチリガンド分子に共通するＤＳＬドメインとＥＧＦ様ドメインを有する分子で、ヒト型ノッチ（ＴＡＮ－１など）のリガンドであるヒトデルタホモログ（以下ヒトデルタ）及びヒトセレイトホモログ（以下ヒトセレイト）が存在すると考え、これらの発見は未分化細胞の分化制御に有効な医薬品の候補となると考え、それらの発見に努めた。
【００１４】
その結果、本発明者は以前の出願においてヒトノッチリガンド分子としてヒトデルター１、ヒトセレイト－１、ヒトセレイト－２分子の３種の分子の遺伝子クローニングを行い、それらの分子が血液未分化細胞に作用することを見いだしている。（国際公開番号ＷＯ９７／１９１７２分化抑制ポリペプチド及びＷＯ９８／０２４５８分化抑制剤を参照）
【００１５】
ヒトノッチリガンド分子に関して、最新の報告によるとヒトデルター１に関しては国際公開番号ＷＯ９７／０１５７１において不完全かつ全長ではないヒトデルター１らしき分子の部分遺伝子並びに部分アミノ酸配列が示され、また、ヒトセレイト－１（ヒトジャグド－１）については国際公開番号ＷＯ９６／２７６１０において全長遺伝子並びに全長アミノ酸配列が、またヒトセレイト－２（ヒトジャグド－２）に関しては同出願において全長ではない部分遺伝子並びに部分アミノ酸配列が示されているが、遺伝子配列において何らかの間違いがあるらしくフレームシフトをおこしてカルボキシ末端のアミノ酸配列が本発明者により国際公開番号ＷＯ９８／０２４５８分化抑制剤に示されたものと全く異なっており、さらにアミノ末端に関しては遺伝子クローニングされておらず遺伝子配列並びにアミノ酸配列は不完全なものとなっている。また、遺伝子配列データベースＧｅｎｂａｎｋリリース９８（１９９６年１２月）において配列を検索するとヒトセレイト－１については４つのエントリーがあり、ＨＳＵ６１２７６、ＨＳＵ７３９３６、ＨＳＵ７７７２０及びＨＳＵ７７９１４として登録されているが、他のヒトノッチリガンド分子に関しては該データベース上には認められなかった。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１６】
本発明の課題は、上記の３つの分子以外の新規なノッチリガンド分子の遺伝子配列、アミノ酸配列を明らかにし、この新規ノッチリガンド分子を提供し、この分子を用いた新し

い治療方法を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【００１７】
本発明者はさらに新しいヒトノッチリガンドの探索のため、上記のヒトデルター１遺伝子を用いたクロスハイブリダイーゼーション法にておこなった。
【００１８】
ヒトデルター１遺伝子の取得は、参考例１および２、並びに国際公開番号ＷＯ９７／１９１７２に従ってを行うことができる。また、ヒトデルター１の全アミノ酸配列をコードするｃＤＮＡ、すなわち配列表の配列番号８の１７９番から２３４７番の配列を有するＤＮＡを含むベクターｐＵＣＤＬ－１Ｆを大腸菌ＪＭ１０９に遺伝子導入した形質転換細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ：ＪＭ１０９－ｐＵＣＤＬ－１Ｆとして日本国茨城県つくば市東１丁目１番３号に所在の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。寄託日は平成８年１０月２８日であり、寄託番号はＦＥＲＭ ＢＰ－５７２８。
【００１９】
このヒトデルター１遺伝子の色々な長さ部分遺伝子調製し、これらをプローブとして用い、多くのｃＤＮＡライブラリーを色々なハイブリダイーゼション条件でスクリーニングを行い、クロスハイブリダイゼーションにて新たなノッチリガンド様分子を発見すべく進めた。
【００２０】
そして、鋭意研究の結果、ヒト胎児肺ｃＤＮＡライブラリーよりノッチリガンド分子に共通するＤＳＬドメインを有している新規分子、新規ヒトデルター２のアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡの単離に成功し、このｃＤＮＡを用いて各種形態を有する蛋白質の発現系を作製した。また、これらの蛋白質の精製法を確立し、精製を行い単離した。
新規ヒトデルター２のアミノ酸配列は、配列表の配列番号１から３に示し、それらをコードするＤＮＡ配列を配列表の配列番号４に示した。
【００２１】
このようにして作製された蛋白質の生理作用を神経未分化細胞、前脂肪細胞、肝細胞、筋芽細胞、皮膚未分化細胞、血液未分化細胞、免疫未分化細胞など、多数の細胞を用いて探索した。その結果、この新規ヒトデルター２は血液未分化細胞に対して分化制御作用を有し、かつ未分化な状態に維持する生理作用を有することを見いだした。また、さらに血管内皮細胞に対し、増殖抑制作用を有することを見出した。
さらにマウスに対する毒性試験では明らかな毒性は観察されず有効な医薬品となる効果を示し、本発明が完成した。したがって本発明分子を含む薬剤、本発明分子を含む培地、本発明分子が固定化された器材は、血液未分化細胞などの未分化細胞を未分化な状態で保つことができる全く新しい医薬品、医療品である。また該ヒトデルター２を免疫原として抗体を作製し、精製法を確立し、本発明が完成した。
【００２２】
すなわち、本発明は少なくとも配列表の配列番号１に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、少なくとも配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、少なくとも配列表の配列番号３に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチドから構成され、未分化細胞の分化抑制作用を有する該ポリペプチド、未分化細胞が脳神経、筋肉系未分化細胞以外の未分化細胞である未分化細胞の分化抑制作用を有する該ポリペプチド、未分化細胞が血液未分化細胞である未分化細胞の分化抑制作用を有する該ポリペプチド、また、血管細胞に作用する該ポリペプチドに関する。また、これらポリペプチドを含有する医薬組成物、細胞の分化抑制作用を有する該医薬品組成物、細胞が血液未分化細胞である該医薬品組成物、血管細胞の調節作用を有する該医薬品組成物に関し、さらに、これらポリペプチドを含有する細胞培養培地、またこの培地が血液未分化細胞用の細胞培養培地、これらポリペプチドが固定化された器材に関する。また、該培地もしくは該器材を用いた細胞の培養方法、細胞が血液朱分化細胞である該培養方法に関する。
【００２３】

さらに、少なくとも配列表の配列番号１に記載のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ、少なくとも配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列をコードする該ＤＮＡ、少なくとも配列表の配列番号３に記載のアミノ酸配列をコードする該ＤＮＡ、配列表の配列番号４に記載の遺伝子配列の３５５番から９２７番の遺伝子配列を有する該ＤＮＡ、配列表の配列番号４に記載の遺伝子配列の３５５番から１８５４番の遺伝子配列を有する該ＤＮＡ、配列表の配列番号４に記載の遺伝子配列の３５５番から２３３１番の遺伝子配列を有する該ＤＮＡに関し、これらのＤＮＡ群の中から選ばれるＤＮＡと、宿主細胞中で発現可能なベクターＤＮＡと連結してなる組み換えＤＮＡ体、これら組み換えＤＮＡ体により形質転換された細胞、該細胞と共にヒト由来細胞を培養する培養方法、また、該形質転換された細胞を培養し培養物中より生産された化合物を採取することを特徴とする該ポリペプチドの製造方法、また、配列表の配列番号３のアミノ酸配列を有するポリペプチドを特異的に認識する抗体に関する。

【発明の効果】

【００２４】

本発明の新規ヒトデルター２分子は血液未分化細胞をはじめとする未分化細胞の増殖、分化抑制にとって有効な化学品となり、医薬品、医療品として使用が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２５】

以下、本発明を詳細に説明する。

遺伝子操作に必要なｃＤＮＡの作製、ノーザンブロットによる発現の検討、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング、組換えＤＮＡの作製、ＤＮＡの塩基配列の決定、ｃＤＮＡライブラリーの作製等の一連の分子生物学的な実験は通常の実験書に記載の方法によって行うことができる。前記の通常の実験書としては、たとえば、Ｍａｎｉａｔｉｓらの編集した Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ ｌａｂｏｒａｒｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，１９８９，Ｅｄｓ．，Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌｏｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを挙げることができる。

【００２６】

本発明のポリペプチドは少なくとも配列表の配列番号１から３のアミノ酸配列からなるポリペプチドを有するが、自然界で生じることが知られている生物種内変異、アレル変異等の突然変異及び人為的に作製可能な点変異による変異によって生じる改変体も、それらが配列表の配列番号１から３のポリペプチドの性質を失わない限り本発明の新規化合物に含まれる。そのアミノ酸の改変、置換に関しては例えばＢｅｎｎｅｔｔらの出願（国際出願番号WO９６／２６４５）などに詳しく記載されており、これらを参考にして作製することができる。

【００２７】

また、配列表の配列番号１から３のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするＤＮＡ配列については配列表の配列番号４にアミノ酸配列とともに示した。この遺伝子配列に関し、アミノ酸レベルの変異がなくとも、自然界から分離した、染色体ＤＮＡ、またはｃＤＮＡにおいて、遺伝コードの縮重により、そのＤＮＡがコードするアミノ酸配列を変化させることなくＤＮＡの塩基配列が変異した例はしばしば認められる。さらに、これらの配列は人為的にも改変が可能である。また、５'非翻訳領域及び３'非翻訳領域はポリペプチドのアミノ酸配列の規定には関与しないので、それらの領域のＤＮＡ配列は変異しやすい。このような遺伝コードの縮重によって得られる塩基配列も本発明のＤＮＡに含まれる。

【００２８】

本発明で記載する未分化細胞とは、特定の刺激によって増殖可能な細胞であり、かつ特定の刺激によって特定の機能を有する細胞に分化可能な細胞と規定され、これらの中には皮膚組織系の未分化細胞、脳神経系の未分化細胞、筋肉系の未分化細胞、血液系の未分化細胞などが含まれ、各々幹細胞といわれる自己複製能力を有しかつその系統の細胞を生み

出す能力を有する細胞を含む。また、分化抑制作用とは、これらの未分化細胞が自律的もしくは他律的に分化する現象を抑制する作用であり、具体的には未分化な状態を維持する作用である。また、脳神経系未分化細胞とは、特定の刺激に伴い、特定の機能を有する脳、神経の細胞にのみ分化する能力を有する細胞と規定できる。また、筋肉系未分化細胞とは特定の刺激に伴い、特定の機能を有する筋肉細胞にのみ分化する能力を有する細胞と規定される。また、本発明で記載する血液未分化細胞とは、血液コロニーアッセイで同定が可能な特定の血液系列に分化することが運命づけられた血液前駆細胞および全ての系列への分化能と自己複製能を有する造血幹細胞を含む細胞群と規定される。また、本発明において血管細胞とは血管内皮細胞を主構成細胞とする血管を構成する細胞の総称である。

【００２９】

配列表において、 配列表の配列番号１のアミノ酸配列は本発明の新規ヒトデルター２のシグナルペプチドを除いた活性中心の配列、すなわちアミノ末端からＤＳＬドメインまでのアミノ酸配列であり、配列番号３に示した本発明の新規ヒトデルター２の成熟型全長アミノ酸配列のアミノ酸番号１番から１９１番に相当している。

配列番号２のアミノ酸配列は、本発明の新規ヒトデルター２のシグナルペプチドを除いた細胞外ドメインの配列であり、配列番号３に示した本発明の新規ヒトデルター２成熟型全長アミノ酸配列のアミノ酸番号１番から５００番に相当している。

【００３０】

配列番号３のアミノ酸配列は、本発明の新規ヒトデルター２の成熟型全長アミノ酸配列である。

配列番号４の配列は本発明の新規ヒトデルター２のｃＤＮＡ配列およびそのコード領域に対応する全アミノ酸配列である。

配列番号５は本発明で使用したＦＬＡＧペプチドをコードするＤＮＡ配列及びＦＬＡＧペプチドアミノ酸配列である。

配列番号６及び７は参考例１で使用したプライマーのＤＮＡ配列である。

【００３１】

配列番号８は本発明で使用したヒトデルター１の全アミノ酸配列及びそれをコードするｃＤＮＡ配列である。

配列番号９、１０、１２及び１３は実施例１で使用したプライマーのＤＮＡ配列である。

配列番号１１は実施例１で使用したプローブのＤＮＡ配列である。

配列番号１４は実施例１及び２で使用したプローブのＤＮＡ配列である。

配列番号１５及至２４は実施例３で使用したプライマーのＤＮＡ配列である。

なお、配列表に記載されたアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれアミノ基末端（以下Ｎ末）及びカルボキシル基末端（以下Ｃ末）であり、また塩基配列の左端及び右端はそれぞれ５'末端及び３'末端である。

【００３２】

未知のヒトノッチリガンドの遺伝子をクローニングするために次の方法が考え得る。ヒトノッチリガンドは生物の進化の過程で、ある程度アミノ酸配列、遺伝子配列が保存されていることから、別のノッチリガンド分子の遺伝子をプローブに用いてクローニングすることは原理的に可能である。しかしながら、このようなクロスハイブリダイゼーション法においては、どの部分をプローブとして用いるのが適当であるか、ハイブリダイゼーションの条件はどのようにするかなど多くの検討点があり、決して容易ではない。また、クロスハイブリダイゼーション法は多くの類似の遺伝子を同時にクローニングしてしまうため遺伝子配列解析に時間がかかるため、クローニングした遺伝子が目的の分子であるかどうか同定することは極めて困難であった。

【００３３】

本発明者はヒトデルター１遺伝子から１０種類以上の遺伝子断片を作製し、これらをプローブとして１０種類以上の異なる臓器由来のｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングを数多くのハイブリダイゼーション条件、洗浄条件にて行ない、新しいデルタ様分子の発見

に努めた。

【００３４】

このプラークハイブリダイゼーションにおいてプローブをアイソトープ標識、及び各種非アイソトープ標識し、ライブラリーをスクリーニングすることによってクローンを得ることができる。アイソトープの標識法としては例えば［^{32}Ｐ］γ－ＡＴＰとＴ４ポリヌクレオチドキナーゼを用いて末端をラベルする方法や、他のニックトランスレーション法またはプライマー伸長法などによる標識法が利用できる。

【００３５】

その結果、本発明者は実施例１において、配列表の配列番号８に示したヒトデルター１の全長遺伝子の部分遺伝子、すなわち配列表の配列番号１１に示した遺伝子配列を有するプローブを用いてヒト胎児肺ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングを行い、１次スクリーニングではおよそ１２０個のポジティブプラークを分離し、２次スクリーニングにおいて、およそ８０個のポジティブプラークをクローン化し、これらのクローンの遺伝子配列の決定をおこなった。これらをクローニングした遺伝子の大半はプローブに用いたヒトデルター１遺伝子であったが、この中の５つのクローンがヒトデルター１に類似した本発明の新規ヒトデルター２遺伝子であることであることが判明し、目的の新規ノッチリガンド分子を見いだすことに成功した。

【００３６】

しかしながら上記の５つのクローン中にはシグナルシークエンス並びにアミノ末端の配列が含まれていなかったために、さらに全長遺伝子を入手するために配列表の配列番号１４に示した遺伝子配列を有する新しいプローブを作製し、さらに該ヒト胎児肺ｃＤＮＡライブラリーを再度スクリーニングして全長遺伝子のクローニングに成功した。

この配列をデータベース（Ｇｅｎｂａｎｋリリース９８、１９９６年１２月）で比較したところ、これらは新規な配列であった。

【００３７】

ｃＤＮＡを組み込むプラスミドとしては、実施例１に記載したｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＫＳ以外にも、例えば大腸菌由来のｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＵＣ１１８、ｐＵＣ１１９（いずれも日本国宝酒造社製）などが挙げられるが、その他のものであっても宿主内で複製増殖できるものであればいずれも用いることができる。またｃＤＮＡを組み込むファージベクターとしては、例えばλｇｔ１０、λｇｔ１１などが挙げられるが、その他のものであっても宿主内で増殖できるものであれば用いることができる。このようにして、得られたプラスミドは適当な宿主、例えばエシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属菌、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属菌などにカルシウムクロライド法等を用いて導入する。上記エシェリヒア属菌の例としては、エシェリヒア コリＫ１２ＨＢ１０１、ＭＣ１０６１、ＬＥ３９２、ＪＭ１０９などが挙げられる。上記バチルス属菌の例としてはバチルス、サチリスＭＩ１１４等が挙げられる。また、ファージベクターは、例えば増殖させた大腸菌にインビトロパッケージング法（Ｅｎｑｕｉｓｔ ａｎｄ Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇ、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，６８，２８１－，１９７９）を用いて導入することができる。

【００３８】

該アミノ酸配列をＫｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅの方法（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５，１９８２）に従って、アミノ酸配列から疎水性部分、親水性部分を解析した。その結果、本発明の新規ヒトデルター２は細胞膜通過部分を１つ有する細胞膜蛋白質として、細胞上に発現されることが明らかとなった。

【００３９】

新規ヒトデルター２のアミノ酸配列の解析によれば、新規ヒトデルター２の前駆体のアミノ酸配列は配列表の配列番号４のアミノ酸配列に示す６８５アミノ酸残基からなり、シグナルペプチド領域は同配列表のアミノ酸配列の－２６番のメチオニンから－１番のグリシンにあたる２６アミノ酸残基、細胞外領域は同配列表の１番のセリンから５００番のセリンにあたる５００アミノ酸残基、細胞膜通過領域は同配列表のアミノ酸配列の５０１番

のフェニルアラニンから５２６番のバリンにあたる２６アミノ酸残基、細胞内領域は同配列表の５２７番のアルギニンから６５９番のバリンにあたる１３３アミノ酸残基が該当することが推定された。ただし、これらの各部分は、あくまでもアミノ酸配列から予測されたドメイン構成であり、実際に細胞上および溶液中での存在形態は、上記の構成と若干異なることも十分考えられ、上記に一応規定された各ドメインの構成アミノ酸が、５から１０アミノ酸配列前後することも考えられる。

【００４０】

少なくとも、実施例５に記載したようにＣＯＳ－７細胞で発現させ、生産、精製した該ヒトデルター２ポリペプチドのＮ末端アミノ酸配列は配列表の配列番号２の１番目のセリンから始まるアミノ酸配列を有している。同様に他の動物細胞で発現させた場合でも同一のＮ末端を有することが期待される。

【００４１】

本発明分子新規ヒトデルター２の１９９７年４月時点までに報告のあるノッチリガンド分子との全長アミノ酸配列の比較では、ヒト由来の分子としてヒトデルター１（配列表の配列番号８のアミノ酸配列）とは４８．５％、ヒトセレイトー１（Ｇｅｎｂａｎｋ ＨＳＵ６１２７６及びＨＳＵ７３９３９）とは４０．３％、ヒトセレイトー２（本発明者ら出願番号平８－１８６２２分化抑制剤）とは４２．７％であり、他の脊椎動物のデルタに関してはマウスデルター１（Ｄｌｌ１、Ｇｅｎｂａｎｋ ＭＭＤＥＬＴＡ１）とは４８．７％、カエルデルター１（Ｇｅｎｂａｎｋ ＸＥＬＸＤＥＬ）とは４７．０％、カエルデルター２（Ｇｅｎｂａｎｋ ＸＬＵ７０８４３）とは４９．７％、ニワトリデルター１（Ｇｅｎｂａｎｋ ＧＧＵ２６５９０）とは４７．９％であった。

【００４２】

これらの結果から、本発明の新規ヒトデルター２はヒトのみならず、他種の生物ホモログですら全く報告のない新規な分子であることが明らかであり、これらの物質とは異なる新規なアミノ酸配列を有する新規な物質であり、本発明の発明者により初めて明らかにされた物質である。また、上記のデータベース上の全ての生物種の検索においても新規ヒトデルター２と同一配列を有するポリペプチドは見いだされなかった。

【００４３】

ノッチのリガンドホモログは進化論的に保存された共通の構造配列を有している。すなわちＤＳＬ配列と繰り返して存在するＥＧＦ様配列である。新規ヒトデルター２とヒトデルター１との比較により、新規ヒトデルター２のアミノ酸配列からこれら保存された構造配列を推定した。

すなわち、ＤＳＬ配列は配列表の配列番号４のアミノ酸配列の１４９番のシステインから１９１番のシステインにあたる４３アミノ酸残基に相当した。ＥＧＦ様配列は８回繰り返して存在し、配列表の配列番号４のアミノ酸配列のうち、第１ＥＧＦ様配列は１９６番システインから２２４番システインまで、第２ＥＧＦ様配列は２２７番システインから２５５番システインまで、第３ＥＧＦ様配列は２６２番システインから２９５番システインまで、第４ＥＧＦ様配列は３０２番システインから３３３番システインまで、第５ＥＧＦ様配列は３４０番システインから３７３番システインまで、第６ＥＧＦ様配列は３８０番システインから４１１番システインまで、第７ＥＧＦ様配列は４１８番システインから４４９番システインまで、第８ＥＧＦ様配列は４５８番システインから４９１番システインに該当した。

【００４４】

新規ヒトデルター２のアミノ酸配列から予想されることとして、糖鎖が付加される部分はＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミンがＮ－グリコシド結合可能な部分として、配列表の配列番号４のアミノ酸配列の８２番、１５７番、１７９番、３６７番の４カ所のアスパラギン残基が挙がられる。また、Ｎ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミンのＯ－グリコシド結合を推定する部分として、セリンまたはスレオニン残基が頻出する部分が考えられる。これらの糖鎖が付加されたタンパクの方がポリペプチドそのものよりも一般に生体内での分解に対して安定であり、また強い生理活性を有していると考えられる。したがって、配列表の

配列番号１、２または３の配列を含有するポリペプチドのアミノ酸配列の中にＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミンがＮ－グルコシドやＮ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミンなどの糖鎖がＮ－グリコシドあるいはＯ－グルコシド結合してなるポリペプチドも本発明に含まれる。実施例５に示したように本発明のヒトデルター２はＣＯＳ－７細胞に遺伝子導入して発現させると、糖鎖の付加により異なる分子量を有する蛋白質として、少なくとも２種類以上の形態をとって発現される。

【００４５】

ショウジョウバエノッチおよびそのリガンドの結合に関する研究により、ショウジョウバエノッチのリガンドがノッチに結合するために必要なアミノ酸領域は、シグナルペプチドが切断された成熟体蛋白質のＮ末からＤＳＬ配列までであることが明らかにされている（国際公開番号ＷＯ９２／１９７３４）。また、同様に線虫を用いたＦｉｔｚｇｅｒａｌｄとＧｒｅｅｎｗａｌｄ（Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、１２１、４２７５－４２８２、１９９５）の研究からノッチリガンド様分子ＡＰＸ－１はノッチ様リセプターの活性化にとって全長のアミノ末端からＤＳＬドメインまで十分であることが明らかにされている。

【００４６】

これらのことから、ヒトノッチリガンド分子のリガンド作用発現に必要な領域は少なくともＤＳＬドメイン、すなわち配列表の配列番号１のアミノ酸配列の１４９番のシステインから１９１番のシステインを含む領域であり、また、少なくともヒトデルター１のリガンド作用の発現に必要な領域は配列表の配列番号１に示した新規アミノ酸配列であり、更に少なくともヒトセレイトー１のリガンド作用の発現に必要な領域は配列表の配列番号２に示した新規アミノ酸配列であることがわかる。

【００４７】

また、実施例２に示したように、配列表の配列番号４の遺伝子配列の一部もしくは全部をコードするＤＮＡを用いれば、新規ヒトデルター２のｍＲＮＡの検出が可能である。たとえば、これらの遺伝子の発現を調べる方法として、配列表の配列番号４の一部の遺伝子配列を有する１２ｍｅｒから１６ｍｅｒ以上、さらに望ましくは２０ｍｅｒ以上の相補し得る核酸、つまりアンチセンスＤＮＡ、ＲＮＡ、及びそれらがメチル化、メチルフォスフェート化、脱アミノ化、またはチオフォスフェート化された誘導体を用い、ハイブリダイゼーション、ＰＣＲ等の手法によって行うことが出来る。同様な方法でマウス等の他の生物の本遺伝子のホモログの検出や遺伝子クローニングができる。さらに、ヒトを含めたゲノム上の遺伝子のクローニングも同様に可能である。従って、そのようにしてクローニングされたこれら遺伝子を用いれば、ヒトデルター２の更に詳細な機能も明らかにすることが出来る。例えば、近年の遺伝子操作技術を用いれば、トランスジェニックマウス、ジーターゲッティングマウス、また、本遺伝子と関連する遺伝子を共に不活化したダブルノックアウトなどのあらゆる方法を用いることが出来る。また、本遺伝子のゲノム上の異常があれば、遺伝子診断、遺伝子治療への応用も可能である。

【００４８】

尚、本発明の新規ヒトデルター２の全アミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを含むベクターｐＢＳＤＬ－２を大腸菌ＪＭ１０９に遺伝子導入した形質転換細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ：ＪＭ１０９－ｐＢＳＤＬ－２として日本国茨城県つくば市東１丁目１番３号に所在の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。寄託日は平成９年５月９日であり、寄託番号はＦＥＲＭ ＢＰ－５９４１。

【００４９】

新規ヒトデルター２ポリペプチドを生産する方法は実施例３に示したように、発現ベクターｐｃＤＮＡ３を用いて行うことができる。さらに、上記の方法にて分離した新規ヒトデルター２のアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを用いた色々な形態を有した新規ヒトデルター２ポリペプチドの生産、精製には多数の方法が成書によって知られている（Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，１９９０．および横田ら、バイオマニュアルシリーズ４，遺伝子導入と発現・解析法，羊土社、１９９４）。すなわち

、分離した該ヒトデルター２のアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを適当な発現ベクターにつなぎ、動物細胞、昆虫細胞などの真核細胞、バクテリアなどの原核細胞を宿主として生産させることができる。

【００５０】

本発明の新規ヒトデルター２を発現させる際に、本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡはその５'末端に翻訳開始コドンを有し、また、３'末端には翻訳終止コドンを有してもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは適当な合成ＤＮＡアダプターを用いて付加することもできる。更に該ＤＮＡを発現させるには上流にプロモーターを接続する。ベクターとしては上記の大腸菌由来プラスミド、枯草菌由来プラスミド、酵母由来プラスミド、あるいはλファージなどのバクテリオファージおよびレトロウィルス、ワクシニアウィルスなどの動物ウィルスなどが挙げられる。

【００５１】

本発明に用いられるプロモーターとしては、遺伝子発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合はｔａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーターなどが好ましく、宿主がバチルス属菌である場合にはＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーターなどが好ましく、宿主が酵母である場合にはＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーターなどが好ましい。

宿主が動物細胞である場合には、ＳＶ４０由来のプロモーター、レトロウィルスのプロモーター、メタルチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが利用できる。

本発明のポリペプチドを発現させる時、配列表の配列番号１、２もしくは３のアミノ酸配列をコードするＤＮＡのみでもかまわないが、産生されたポリペプチドの検出を容易にするための既知抗原エピトープをコードするｃＤＮＡを付加したり、多量体構造を形成させるためにイムノグロブリンＦｃをコードするｃＤＮＡを付加することで、特別の機能を付加した蛋白質を生産させることもできる。

【００５２】

新規ヒトデルター２に関して本発明者は実施例３に示したごとく、細胞外タンパク質を発現する発現ベクターとして、 １）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列の１番から５００番のアミノ酸をコードするＤＮＡ、 ２）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列の１番から５００番のアミノ酸のＣ末側に８アミノ酸、すなわちAsp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lysのアミノ酸配列（以下ＦＬＡＧ配列、配列表の配列番号５にこれをコードするＤＮＡ配列の１例を示す）を持つペプチドを付加したキメラタンパク質をコードするＤＮＡ、および ３）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列の１番から５００番のアミノ酸のＣ末側にヒトＩｇＧ１のヒンジ部分以下のＦｃ配列を付加し、ヒンジ部分のジスルフィド結合により２量体構造を有するキメラタンパク質をコードするＤＮＡ、 を各々発現ベクターｐｃＤＮＡ３（米国ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）に各々別々につなぎ、新規ヒトデルター２の細胞外部分発現ベクターを作製した。

【００５３】

また、新規ヒトデルター２の全長タンパク質を発現する発現ベクターとして、 ４）配列表の配列番号３の１番から６５９番のアミノ酸をコードするＤＮＡ、および ５）配列表の配列番号３の１番から６５９番のアミノ酸のＣ末端側にＦＬＡＧ配列を持つペプチドを付加したキメラタンパク質をコードするＤＮＡを発現ベクターｐｃＤＮＡ３に各々別々につなぎ、新規ヒトデルター２の全長発現ベクターを作製した。

このようにして構築された該ヒトデルター２をコードするＤＮＡを含有する発現プラスミドを用いて、形質転換体を製造した。

宿主としては例えばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞などが挙げられる。動物細胞としては、例えばサル細胞であるＣＯＳ－７、Ｖｅｒｏ、チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ、カイコ細胞ＳＦ９などが挙げられる。

【００５４】

実施例４に示したごとく、上記の１）～５）の発現ベクターをそれぞれ別々に遺伝子導入し、ヒト新規ヒトデルター２をＣＯＳ－７細胞（理化学研究所、細胞開発銀行から入手可能、ＲＣＢ０５３９）で発現させ、これら発現プラスミドで形質転換された形質転換体が得られる。さらに、各形質転換体をそれぞれ公知の方法により、適当な培地中で適当な培養条件により培養することによって各種新規ヒトデルター２ポリペプチドを製造することができる。

実施例５に示したごとく、上記の様な培養物から新規ヒトデルター２ポリペプチドを分離精製することができる。また、一般的には下記の方法により行うことができる。

【００５５】

すなわち、培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法、たとえば遠心分離法などで菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破砕した後、遠心分離や濾過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中に尿素、塩酸グアニジンなどのタンパク変性剤や、トリトンＸ－１００などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養溶液中に分泌される場合には、培養液を公知の方法、たとえば遠心分離法などで菌体あるいは細胞と分離し、上清を集める。

【００５６】

このようにして得られた細胞抽出液あるいは細胞上清に含まれる新規ヒトデルター２は公知のタンパク質精製法を用いることで、精製できる。その精製の過程でタンパク質の存在を確認するために、上記に示したＦＬＡＧ、ヒトＩｇＧＦｃなどの融合タンパクの場合には、それら既知抗原エピトープに対する抗体を用いたイムノアッセイで検出して精製を進めることができる。また、このような融合タンパク質として発現させない場合には、実施例６に記載した抗体を用いて検出することができる。

【００５７】

新規ヒトデルター２を特異的に認識する抗体は実施例６に示したように作製することができる。また成書（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，Ｅ．Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ ＳｐｒｉｎｇＨａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）に示された各種の方法ならびに遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて、細胞に発現させた遺伝子組換え体抗体によっても作製することができる。このように作製された抗体は新規ヒトデルター２の精製に利用できる。すなわち、実施例６に示したこれらの新規ヒトデルター２を特異的に認識する抗体を用いれば、本発明の新規ヒトデルター２の検出、測定が可能であり、細胞の分化異常に伴う疾患例えば悪性腫瘍など疾患の診断薬として使用でき得る。

【００５８】

精製方法としてより有効な方法としては抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。この際に用いる抗体としては実施例６に記載した抗体を用いることができる。また、融合タンパクの場合には、実施例５に示したように、ＦＬＡＧであればＦＬＡＧに対する抗体、ヒトＩｇＧＦｃであればＰｒｏｔｅｉｎ Ｇ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａを用いることができる。

【００５９】

このように精製された新規ヒトデルター２タンパクの生理機能を、各種細胞株、マウス、ラットなどの生物個体を用いた各種生理活性アッセイ法、分子生物学的手法に基づく細胞内シグナル伝達の各種アッセイ法、ノッチリセプターとの結合などの色々なアッセイ法にて知ることができる。

【００６０】

本発明者は新規ヒトデルター２のＩｇＧｌキメラ蛋白質を用いて、血液未分化細胞への作用を観察した。すなわち、実施例７に示したようにＣＤ３４陽性細胞画分を濃縮した請帯血由来血液未分化細胞において、各種サイトカイン存在下でコロニー形成する血液未分化細胞に対してコロニー形成作用の抑制活性を有することを見いだした。

またさらに、実施例８に記載したようにＣＤ３４陽性細胞画分を濃縮した臍帯血由来血

液未分化細胞を各種サイトカイン存在下の無血清培養条件でヒトデルター２存在下で２週間培養を行い、ヒト血液未分化細胞の中で最も未分化な造血幹細胞としてされているＬＴＣ－ＩＣ（Ｌｏｎｇ－Ｔｅｒｍ Ｃｕｌｔｕｒｅ－Ｉｎｉｔｉａｔｉｎｇ Ｃｅｌｌｓ）を計測した結果、その数を維持する活性が見出された。ついで、実施例９に示したようにヒトデルター２はヒト血液未分化細胞に結合することを見出した。

【００６１】

この結果から、新規ヒトデルター２は血液未分化細胞の分化を抑制し、それらの作用は血液幹細胞からコロニー形成細胞にわたって作用することが明らかである。これらの生理作用は血液未分化細胞の体外増殖に必要な作用であり、特に新規ヒトデルター２を含有する細胞培養培地で培養した細胞は抗癌剤投与後の骨髄抑制回復に有効であり、他の条件を整えることにより体外での造血幹細胞の増幅を可能とするであろう。さらに、医薬品として用いた場合には、抗癌剤などの副作用で見られる骨髄抑制作用を保護し、軽減する作用がある。

【００６２】

また、これらの実験において、このＬＴＣ－ＩＣ維持活性、並びに血液細胞に対する結合は本発明者により先に同様な活性が示されたヒトデルター１（ＷＯ９７／１９１７２）よりも本発明の新規ヒトデルター２は血液細胞に対し強い活性を有していることが示された。

【００６３】

実施例９に示したようにＣＤ３４陽性の血液未分化細胞にヒトデルター２のＩｇＧ１キメラ蛋白質は結合する。この結合することから本発明のポリペプチドは細胞の分離や検出に用いることができる。分離方法としては実施例９に記載したフローサイトメーターを用いた方法でもかまわないが、実施例１１に記載した本発明のポリペプチドを固定化した器材を用いる方が簡便と考えられる。したがって、本発明のポリペプチドを用いた細胞の分離方法も本願に含まれ、さらに本発明のポリペプチドを固定化した器材を用いた細胞の分離方法、この分離方法に応用した細胞の分離装置も本願に含まれる。これら分離装置並びに分離方法に関しては、色々な成書に示されている抗体を用いた細胞分離方法の全てが利用できる。例えば、磁気ビーズと抗体を組み合わせたノルウェー国Ｄｙｎａｌ社のダイナビーズが利用できる。

【００６４】

またさらに、実施例１２に示したように本発明新規ヒトデルター２のＩｇＧ１キメラ蛋白質は血管内皮細胞の増殖に対して抑制的作用を有しており、血管新生作用を阻害する活性を有する。したがって、ＦｏｌｋｍａｎとＫｌａｇｓｂｒｕｎ（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３５，４４２－４４７、１９８７）によって提唱された血管新生を抑制することで治療できるであろう疾患、病態に対する治療薬剤として使用できる。具体的な用途に関しては上記の参考文献に記されているが、例えば悪性腫瘍等の疾患を挙げることができる。

さらに、血液細胞、血管細胞以外の未分化細胞においても、細胞の分化を抑制する作用が主に期待でき、また組織再生を促す作用等が期待できる。

【００６５】

医薬品として用いるならば、本発明のポリペプチドを適当な安定化剤、例えばヒト血清アルブミンなどと共に凍結乾燥品を作製し、用時注射用蒸留水にて溶解もしくは懸濁して使用し得る形状が望ましい。例えば０．１から１０００μｇ／ｍｌの濃度に調製した注射剤、点滴剤として提供することができる。本発明者は実施例１３に示したように本発明の化合物１ｍｇ／ｍｌ、ヒト血清アルブミン５ｍｇ／ｍｌとなるようにバイアルに小分けし、長期にわたって該化合物の活性は保持された。さらに、細胞を体外にて培養、活性化させる場合には医薬品同様に、凍結乾燥品、もしくは溶液剤を作製して、培地に加える、もしくは培養に使用する容器に固定化することができる。また、本発明のポリペプチドの毒性については、マウスに対していずれのポリペプチドも１０ｍｇ／Ｋｇを腹腔内投与したがマウスの死亡例は確認されなかった。

【００６６】

また、本発明のインビトロの生理活性は、あらゆる疾患モデルマウス、またはそれらに準ずる疾患に似た症状を呈するラット、サル等の動物をモデルとして投与を行い、その身体的、生理的な機能の回復、異常を調べることにより可能となる。例えば、造血細胞に関する異常であれば、５－ＦＵ系の抗癌剤を投与して、骨髄抑制モデルマウスを作製し、このマウスに本発明の化合物を投与した群としなかった群の骨髄細胞、末梢血細胞の数、生理的な機能を調べることで明らかになる。また更に、体外で造血幹細胞を含む造血未分化細胞の培養、増殖を調べる場合には、マウス骨髄細胞を培養器などを利用して、培養を行い、その際に本発明の化合物を加えた群と加えなかった群で培養後の細胞を致死量放射線照射マウスに細胞移植を行い、その結果の回復の度合いを、生存率、血球数の変動などを指標にすることで調べることが出来る。勿論、これらの結果が人にも外挿できるため、本化合物の薬効としての評価として有効なデータを得ることが出来る。

【００６７】

本発明の化合物を医薬品として利用する場合、その適応として、細胞の分化異常に伴う疾患、例えば白血病、悪性腫瘍の治療があげられ、体外でヒト由来細胞を培養して、その本来の機能を保ったまま増殖させる、もしくは新たな機能を持たせる等を行う細胞治療、組織損傷後の再生時に投与することにより本来その組織が有していた機能を損なうことなく再生させる治療法などの応用が可能である。その際の投与量としてはその形態などにもよるが、具体的には１０μｇ／Ｋｇから１０ｍｇ／Ｋｇ程度投与すればよい。
また、さらに強い生理活性を有する形態として、多量体を形成し得る形態で発現させることが望ましい。

【００６８】

多量体構造を有する新規ヒトデルター２は、実施例３および４に記載したヒトＩｇＧのＦｃ部分とのキメラタンパク質として発現させて抗体のヒンジ部分によりジスルフィド結合をした多量体として発現させる方法、また、抗体認識部位をＣ末端もしくはＮ末端に発現するキメラタンパクとして発現させ、発現させた該ヒトデルター２の細胞外部分を含むポリペプチドをＣ末端もしくはＮ末端の抗体認識部位を特異的に認識する抗体と反応させることにより多量体を形成させる方法が挙げられる。さらに、別の方法として、抗体のヒンジ領域部分のみとの融合タンパクを発現させて、ジスルフィド結合にて２量体を形成させる方法、もしくはその他の新規ヒトデルター２の活性に何等影響を与えない方法でジスルフィド結合を生じさせる形のペプチドをＣ末端、Ｎ末端もしくはその他の部位に発現するように作成された融合タンパクから構成された２量体以上の高い比活性を有する多量体型新規ヒトデルター２を得ることもできる。また、さらに配列表の配列番号１、２及び３のアミノ酸配列を含むポリペプチドから選ばれる１つ以上のポリペプチドを遺伝子工学的に２つ以上直列にもしくは並列に並べ多量体構造を発現させる方法などもある。その他、現在知られている２量体以上の多量体構造を持たせるあらゆる方法が適応可能である。したがって、遺伝子工学的な技術により作製される２量体もしくはそれ以上の形態を有する形の配列表の配列番号１、２及び３に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む化合物に関しても本発明に含まれる。

【００６９】

また、その他の方法として、化学的な架橋剤を用いて多量体化する方法が挙げられる。例えば、リシン残基を架橋するジメチルスベロイミデート２塩酸塩など、システイン残基のチオール基で架橋するＮ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミドなど、アミノ基とアミノ基を架橋するグルタールアルデヒドなどが挙げられ、これらの架橋反応を利用して、２量体以上の多量体を形成させることができる。したがって、化学的な架橋剤により作製される２量体もしくはそれ以上の多量体の形態を有す形の配列表の配列番号１、２もしくは３に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む化合物に関しても本発明に含まれる。

【００７０】

体外において細胞を増殖、活性化し、体内に細胞を戻す医療方法への適応には、上記のような形態を有した新規ヒトデルター２を直接培地中に加えることも可能だが、固定化す

る事も同様に可能である。固定化の方法としてはこれらのポリペプチドのアミノ基、カルボキシル基を利用したり、適当なスペーサーを用いたり、上記の架橋剤を用いたりして、培養容器にポリペプチドを共有結合させることができる。実施例１１に固定された器材の作製方法並びにその効果の一例を示した。したがって、固体表面に存在する形態を有す配列表の配列番号１、２もしくは３のアミノ酸配列を含有するポリペプチドに関しても本発明に含まれる。

【００７１】

また、自然界に存在する新規ヒトデルター２は細胞膜蛋白質であることから、これらの分子を発現する細胞と血液未分化細胞を共培養することによっても、実施例７、８、および１２で行った分化抑制作用を発現させることができる。したがって、配列表の配列番号１、２もしくは３のアミノ酸配列をコードするＤＮＡを用いて形質転換するした細胞と未分化細胞を共培養する方法についても本発明に含まれる。実施例１０にその一例を示した。発現させる細胞は実施例で示したサル由来ＣＯＳ－７細胞、マウス由来Ｂａｌｂ３Ｔ３細胞でもかまわないが、ヒト由来の細胞が望ましく、また更に発現させる細胞は細胞株ではなくヒトの体内の血液細胞でも体細胞でもかまわない。したがって、遺伝子治療用のベクターに組み込んで体内で発現させることもできる。遺伝子治療用のベクターとしてはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどが挙げられる。

【００７２】

また、本発明分子すなわち配列表の配列番号１、２もしくは３のアミノ酸配列を有するポリペプチドとこれらのリセプターとの結合を阻害することは細胞分化を促進する分子、化合物を見つけだす手段として利用できる。その方法としては、ラジオアイソトープなどを用いた結合実験、ノッチリセプターの下流分子である転写調節因子群を用いたルシフェラーゼアッセイ、Ｘ線構造解析を行いコンピューター上でのシュミレーションなどあらゆる方法が応用できる。したがって、配列表の配列番号１、２もしくは３のポリペプチドを用いた薬剤スクリーニング方法に関しても本発明に含まれる。

【実施例】

【００７３】

以下に発明を実施する形態について参考例、実施例を示すが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

参考例１　ヒトデルター１プライマーによるＰＣＲ産物のクローニングおよび 塩基配列の決定

Ｃ－デルター１およびＸ－デルター１に保存されたアミノ酸配列に対応した混合プライマー、すなわちセンスプライマーＤＬＴＳ１（配列表の配列番号６に記載）及びアンチセンスプライマーＤＬＴＡ２（配列表の配列番号７に記載）を用いた。

【００７４】

合成オリゴヌクレオチドは固相法を原理とする全自動ＤＮＡ合成機を使用して作成した。全自動ＤＮＡ合成機としては米国アプライドバイオシステム社３９１ＰＣＲ－ＭＡＴＥを使用した。ヌクレオチド、３'－ヌクレオチドを固定した担体、溶液、および試薬は同社の指示に従って使用した。所定のカップリング反応を終了し、トリクロロ酢酸で５'末端の保護基を除去したオリゴヌクレオチド担体を濃アンモニア中にて室温で１時間放置することにより担休からオリゴヌクレオチドを遊離させた。次に、核酸及びりん酸の保護基を遊離させるために、核酸を含む反応液を、封をしたバイアル内において濃アンモニア溶液中で５５℃にて１４時間以上放置した。担体及び保護基を遊離した各々のオリゴヌクレオチドの精製をアプライドバイオシステム社のＯＰＣカートリッジを使用して行い、２％トリフルオロ酢酸で脱トリチル化した。精製後のプライマーは最終濃度が１００ｐｍｏｌ／μｌとなるように脱イオン水に溶解してＰＣＲに使用した。

【００７５】

これらプライマーを用いたＰＣＲによる増幅は以下のように行った。ヒト胎児脳由来ｃＤＮＡ混合溶液（ＱＵＩＣＫ－Ｃｌｏｎｅ ｃＤＮＡ、米国ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）１μｌ

を使用し、１０×緩衝液（５００mM ＫＣｌ、１００mM Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、１５mM ＭｇＣｌ２、０．０１％ゼラチン）５μｌ、ｄＮＴＰ Ｍｉｘｔｕｒｅ（日本国宝酒造社製）４μｌ、前述の脊椎動物デルタホモログに特異的なセンスプライマーＤＬＴＳ１（１００ｐｍｏｌ／μｌ）５μｌおよびアンチセンスプライマーＤＬＴＡ２（１００ｐｍｏｌ／μｌ）５μｌ、及びＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（ＡｍｐｌｉＴａｑ：日本国宝酒造社製、５Ｕ／μｌ）０．２μｌを加え、最後に脱イオン水を加えて全量を５０μｌとして、９５℃で４５秒間、４２℃で４５秒間、７２℃を２分間からなる行程を１サイクルとして、この行程を５サイクル行い、さらに９５℃で４５秒間、５０℃で４５秒間、７２℃を２分間からなる行程を１サイクルとして、この行程を３５サイクル行い最後に７２℃にて７分間放置してＰＣＲを行った。このＰＣＲ産物の一部を２％アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本国日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約４００ｂｐのｃＤＮＡが増幅されていることを確認した。

【００７６】

ＰＣＲ産物の全量を低融点アガロース（米国ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ社製）にて作成した２％アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色後、紫外線照射下にてデルタプライマーによるＰＣＲ産物の約４００ｂｐのバンドを切り出し、ゲルと同体積の蒸留水を加え、６５℃にて１０分間加熱し、ゲルを完全に溶かしたのち、等量のＴＥ飽和フェノール（日本国日本ジーン社製）を加えて、１５０００ｒｐｍ５分間遠心分離後上清を分離し、さらに同様な分離作業をＴＥ飽和フェノール：クロロフォルム（１：１）溶液、さらにクロロフォルムにて行った。最終的に得られた溶液からＤＮＡをエタノール沈澱して回収した。

【００７７】

ベクターとしてｐＣＲＩＩ Ｖｅｃｔｏｒ（米国Ｉｎｖｉｔｏｒｏｇｅｎ社製、以下ｐＣＲＩＩと示す）を用い、ベクターと先のＤＮＡのモル比が１：３となるように混ぜ合わせて、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼ（米国Ｉｎｖｉｔｏｒｏｇｅｎ社製）にてベクターにＤＮＡを組み込んだ。ＤＮＡが組み込まれたｐＣＲＩＩを大腸菌Ｏｎｅ Ｓｈｏｔ Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ Ｃｅｌｌｓ（米国Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に遺伝子導入し、アンピシリン（米国Ｓｉｇｍａ社製）を５０μｇ／ｍｌ含むＬ－Ｂｒｏｔｈ（日本国宝酒造社製）半固型培地のプレートに蒔き、１２時間程度３７℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むＬ－Ｂｒｏｔｈ液体培地２ｍｌに植え付け、１８時間程度３７℃で振盪培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ（米国Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素ＥｃｏＲＩにて消化して、約４００ｂｐのＤＮＡが切れ出されてくることで該ＰＣＲ産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれているＤＮＡの塩基配列を米国アプライドバイオシステム社の螢光ＤＮＡシークエンサー（モデル３７３Ｓ）にて決定した。

【００７８】

参考例２　ヒトデルター１遺伝子の全長クローニングおよびその解析

ヒト胎盤由来のｃＤＮＡライブラリー（λｇｔ－１１にｃＤＮＡが挿入されたもの、米国ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）からプラークハイブリダイゼーションにて全長ｃＤＮＡを持ったクローンの検索を１×１０６相当のプラークから行った。出現したプラークをナイロンフィルター（Ｈｙｂｏｎｄ Ｎ＋：米国Ａｍｅｒｓｈａｍ社製）に転写し、転写したナイロンフィルターをアルカリ処理（１．５ＭＮａＣｌ０．５Ｍ ＮａＯＨを染み込ませたろ紙上に７分間放置）し、次いで中和処理（１．５Ｍ ＮａＣｌ０．５Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．２）、１ｍＭ ＥＤＴＡを染み込ませたろ紙上に３分間放置）を２回行い、次にＳＳＰＥ溶液（０．３６Ｍ ＮａＣｌ、０．０２Ｍ りん酸ナトリウム（ｐＨ７．７）、２ｍＭ ＥＤＴＡ）の２倍溶液中で５分間振とう後洗浄し、風乾した。その後、０．４Ｍ ＮａＯＨを染み込ませたろ紙上に２０分間放置し、５倍濃度のＳＳＰＥ溶液で５分間振とう後洗浄し、再度風乾した。このフィルターを用いて放射性同位元素^{32}Ｐにて標識されたヒトデルター１プローブにてスクリーニングを行った。

【００７９】
放射性同位元素^{32}Ｐにて標識された参考例１で作製されたＤＮＡプローブは以下のように作成した。すなわち、遺伝子配列が決定されたヒトデルター１プライマーによる精製ＰＣＲ産物（約４００ｂｐ）が組み込まれたｐＣＲＩＩより、ＥｃｏＲＩにてベクターより切り出し、低融点アガロースゲルからＤＮＡ断片を精製回収した。得られたＤＮＡ断片をＤＮＡラベリングキット（Ｍｅｇａｐｒｉｍｅ ＤＮＡ ｌａｂｅｌｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ：米国Ａｍｅｒｓｈａｍ社製）を用いて標識した。すなわち、ＤＮＡ２５ｎｇにプライマー液５μｌ及び脱イオン水を加えて全量を３３μｌとして沸騰水浴を５分間行い、その後、ｄＮＴＰを含む反応緩衝液１０μｌ、α－３２Ｐ－ｄＣＴＰ５μｌ、及びＴ４ＤＮＡポリヌクレオチドキナーゼ溶液２μｌを加えて、３７℃で１０分間水浴し、更にその後、セファデックスカラム（Ｑｕｉｃｋ Ｓｐｉｎ Ｃｏｌｕｍｎ Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－５０：独逸国ベーリンガーマンハイム社製）で精製し、５分間沸騰水浴をしたのち、２分間氷冷後使用した。

【００８０】
前述の方法にて作成したフィルターを、各々の成分の最終濃度が５倍濃度のＳＳＰＥ溶液、５倍濃度のデンハルト液（日本国和光純薬社製）、０．５％ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム、日本国和光純薬社製）、及び１０μｇ／ｍｌの沸騰水浴により変性したサケ精子ＤＮＡ（米国Ｓｉｇｍａ社製）であるプレハイブリダイゼーション液中に浸し、６５℃にて２時間振とうした後、前述の方法で^{32}Ｐ標識されたプローブを含むプレハイブリダイゼーション液と同一組成のハイブリダイゼーション液に浸し、６５℃にて１６時間振盪し、ハイブリダイゼーションを行った。

【００８１】
次に、フィルターを０．１％ＳＤＳを含むＳＳＰＥ溶液に浸し、５５℃にて振盪し２回洗浄後、さらに０．１％ＳＤＳを含む１０倍希釈したＳＳＰＥ溶液に浸し、５５℃にて４回洗浄した。洗浄を終了したフィルターを増感スクリーンを使用して、オートラジオグラフィーを行った。その結果、強く露光された部分のクローンを拾い、再度プラークを蒔き直し前述の方法にてスクリーニングを行い、完全に単独のクローンを分離した。

【００８２】
単離されたファージクローンは７クローンであった。成書の方法に従い、これらのすべてのクローンのファージを約１×１０９ｐｆｕ調製し、ファージＤＮＡをウィザードラムダプレップ（米国Ｐｒｏｍｅｇａ社製）にて精製し、制限酵素ＥｃｏＲＩにて消化し、同様にＥｃｏＲＩで消化したｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＫＳ（米国Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）に組み込んだ。これらのクローンの両端のＤＮＡ配列をＤＮＡシークエンサーにより解析したところ、Ｄ５、Ｄ６、Ｄ７の３クローンは共に配列表の配列番号７のＤＮＡ配列の１番から２２４４番の配列を含むクローンであり、Ｄ４のクローンは配列表の配列番号８のＤＮＡ配列の９９９番から２６６３番を含むクローンであった。Ｄ５とＤ４の２クローンはキロシークエンス用デリションキット（日本国宝酒造社製）を用いて添付の説明書に従ってデリションミュータントを作製し、該ＤＮＡシークエンサーを用いて５'方向、３'方向の両方向から、本発明の全長のｃＤＮＡ塩基配列を決定した。

【００８３】
さらに配列表の配列番号８のＤＮＡ配列の１２１４番にあるＸｈｏＩサイトを利用し、Ｄ４とＤ５を制限酵素ＸｈｏＩによって消化して、配列表の配列番号８のＤＮＡ配列全長を含むプラスミドｐＢＳＤｅ１－１を作製した。

【００８４】
実施例１　新規ヒトデルター２のｃＤＮＡクローニング
配列表の配列番号８のヒトデルター１遺伝子をプローブとして用いて新たなヒトデルタホモログの遺伝子クローニングを行った。
プローブとしては参考例２に得た配列表の配列番号８のヒトデルター１全長遺伝子ｐＢＳＤｅｌ－１、もしくは上記に記載した寄託してあるベクターｐＵＣＤＬ－１Ｆを鋳型として用いてＰＣＲ法にて作製した。プライマーは配列表の配列番号９のセンスプライマー

（配列表の配列番号８の６３６番から６５５番のＤＮＡ配列にあたる）及び配列表の配列番号１０のアンチセンスプライマー（配列表の配列番号８の１３３２番から１３５１番のＤＮＡ配列の相補鎖にあたる）を用いた。

【００８５】

ＰＣＲによる増幅の溶液組成はプライマーと鋳型以外は参考例１に記載した溶液組成で、条件は９５℃で４５秒間、５５℃で４５秒間、７２℃を２分間からなる行程を１サイクルとして、この行程を３０サイクル行い、最後に７２℃にて７分間放置してＰＣＲを行った。このＰＣＲ産物の一部を１％アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本国日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約７００ｂｐのｃＤＮＡが増幅されていることを確認した。

【００８６】

このＰＣＲ産物をアガロースゲルより切り出し、ＧｅｎｅｃｌｅａｎＩＩキット（米国Ｂｉｏ１０１社製）にて添付の取扱説明書に従いＤＮＡプローブを精製し、２５ｎｇ／μｌとなるように蒸留水に希釈して、配列表の配列番号１１に示した配列を有するＤＮＡプローブを作製した。

【００８７】

参考例２に記載した方法に従って、上記プローブを用いて、λｇｔ１０にて作製されたヒト胎児肺由来ｃＤＮＡライブラリー（米国Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）をスクリーニングした。ただし、ハイブリダイゼーション条件としては５５℃で１６時間行い、さらに洗浄条件は０．１％ＳＤＳを含むＳＳＣ溶液に浸し、室温で振盪し６回洗浄後、さらに０．１％ＳＤＳを含む３倍希釈したＳＳＣ溶液に浸し、５５℃にて１回洗浄した。

【００８８】

上記の条件でおよそ１２０万個のプラークを１次スクリーニングとして行った結果、約１２０個のプラークがポジティブと判断され、これらを同様な方法で２次スクリーニングを行って各ファージを分離した。

【００８９】

分離したファージＤＮＡを参考例２に記載した方法で精製し、同様に制限酵素ＥｃｏＲＩにて消化し、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＫＳにつなぎ、参考例１に示したのと同様ＤＮＡシークエンサーにてＤＮＡ遺伝子配列を解析した。

【００９０】

約半数以上のクローンは配列表の配列番号８の遺伝子配列を有するヒトデルター１であったが、この中にヒトデルター１には似ているが異なる遺伝子配列を有し、なおかつコンピューターソフトウエアＧｅｎｅｔｙｘＣＤ　Ｖｅｒ３６（ソフトウエア開発株式会社製）にてＧｅｎｂａｎｋリリース９８上には存在しない新規な配列を含むクローンが５つ見いだされた。これらのクローンのＤＮＡ配列を、キロシークエンス用デリションキット（日本国宝酒造社製）を用いて添付の説明書に従ってデリションミュータントを作製するとともに、プライマーウオーキング法と組み合わせて、該ＤＮＡシークエンサーを用いて５'方向、３'方向の両方向から、本発明の全長のｃＤＮＡ塩基配列を決定した。

【００９１】

その結果、クローン４Ａは配列表の配列番号４のＤＮＡ配列の５２６番から３３３９番までの遺伝子配列をコードし（ただし同配列の１２９６番から１５１５番までの配列を欠失していた）、クローン２２は配列表の配列番号４のＤＮＡ配列の１０２９番から３２１３番までに遺伝子配列をコードし、クローン６５は配列表の配列番号４のＤＮＡ配列の７５４番から３２２８番までに遺伝子配列をコードし、クローン９０は配列表の配列番号４のＤＮＡ配列の５５２番から２６１８番までに遺伝子配列をコードし、クローン１０５は配列表の配列番号４のＤＮＡ配列の６６９番から３３３９番までに遺伝子配列をコード（ただしこのクローン１０５には他のクローンでは見られない不明配列の挿入が何カ所も見られるためスプライス前の未成熟なｍＲＮＡに由来すると考えられる）していた。また、クローン６５に関しては配列表の配列番号４のＤＮＡ配列の２２９４番のシトシンがチミンに置換していた。そのため、同配列表のアミノ酸配列の６４７番のセリンがスレオニン

に置換している。

【００９２】

しかしながら、これらのクローンにはいずれも全長のアミノ酸配列をコードしている遺伝子配列を含んでいないことが判明したため、さらに新しいプローブを作製して再度スクリーニングを行った。

新しいプローブは上記で分離したクローン４Ａを鋳型として用いてＰＣＲ法にて作製した。プライマーは配列表の配列番号１２のセンスプライマー（配列表の配列番号４の５２６番から５４５番のＤＮＡ配列にあたる）及び配列表の配列番号１３のアンチセンスプライマー（配列表の配列番号４の９１８番から９３７番のＤＮＡ配列の相補鎖にあたる）を用い、初めのプローブ同様作製した。このプローブのＤＮＡ配列を配列表の配列番号１４に示す。

【００９３】

このプローブを用いて１回目同様同一のｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングを行った。ただし、ハイブリダイゼーション条件としては６５℃で１６時間行い、さらに洗浄条件は０．１％ＳＤＳを含むＳＳＣ溶液に浸し、室温で振盪し６回洗浄後、さらに０．１％ＳＤＳを含む１０倍希釈したＳＳＣ溶液に浸し、６５℃にて２回洗浄した。

このスクリーニングにより同様に新たなクローンを同定し、同様に遺伝子配列を決定したところ、配列表の配列番号４に示すＤＮＡ配列と同一の配列を有するクローンＰと配列表の配列番号４に示すＤＮＡ配列の２６３番から２７６８番の配列を有するクローンＲＡを同定された。この２つのクローンが全長の新規ヒトデルター２のタンパク質をコードしているクローンとして分離できた。尚、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＫＳのＥｃｏＲＩサイトにライゲーションされているクローンＰを含むベクターをｐＢＳＤＬ－２と命名する。

【００９４】

実施例２　新規ヒトデルター２の発現臓器

新規ヒトデルター２のｍＲＮＡの発現を調べるため、あらかじめｍＲＮＡが転写されているフィルターである、Ｈｕｍａｎ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｔｉｓｓｕｅ Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｂｌｏｔ、Ｈｕｍａｎ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｔｉｓｓｕｅ Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｂｌｏｔ ＩＩ、Ｈｕｍａｎ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｔｉｓｓｕｅ Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｂｌｏｔ ＩＩＩ、Ｈｕｍａｎ Ｆｅｔａｌ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｔｉｓｓｕｅ Ｎｏｒｔｈｅｒｎ ＢｌｏｔＩＩ、（すべて米国Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用い、実施例１に記載の配列表の配列番号１４の配列を有するＤＮＡをプローブとして前掲のＤＮＡラベリングキット（ＭｅｇａＰｒｉｍｅ ＤＮＡ ｌａｂｅｌｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ：米国Ａｍｅｒｓｈａｍ社製）にて前述の方法で３２Ｐ標識し、上記のフィルターの添付の取扱説明書にしたがってハイブリダイゼーションを行い発現を調べた。結果を第１図に示す。

【００９５】

その結果、発現されているｍＲＮＡの長さは約３．８ｋｂと５ｋｂの２種類であった。発現部位としてヒト成人組織のうち特に強い発現を認めたのは、心臓であった。また、胎盤、卵巣、小腸、甲状腺、脊髄に比較的強い発現が認められ、骨格筋、肺、肝臓、膵臓、胸腺、前立腺、リンパ節、気管、副腎、骨髄では明かな発現を認めた。一方、極めて弱くしか発現が認められなかったのは胃、脾臓、結腸であり、さらに全く発現が認められなかったのは、脳、腎臓、精巣、末梢血リンパ球であった。ヒト胎児組織においては胎児肺に極めて発現が高く、胎児腎臓に強い発現が認められ、胎児肝臓、胎児脳には若干弱いながら発現が認められた。

【００９６】

これらの結果から本発明の新規ヒトデルター２は成人では心臓に関連する機能を有すると考えられた。またさらに、胎児期の肺に強い発現が認められたことからも、血管細胞の対しての作用も有すると想像された。

【００９７】

実施例３　新規ヒトデルター２発現ベクターの作製

実施例１の新規ヒトデルター２の全長をコードするベクターｐＢＳＤＬ－２を用いて、

次の１）から５）に挙げる新規ヒトデルター２蛋白質の発現ベクターを作製した。制限酵素サイトの付加、短い遺伝子配列の挿入は全て米国Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製ＥｘＳｉｔｅ ＰＣＲ－Ｂａｓｅｄ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔを用い、添付の取扱い説明書に従って行った。

【００９８】

１）分泌型新規ヒトデルター２蛋白質（ＨＤ２ＥＸ）発現ベクター

配列表の配列番号２のアミノ酸配列の１番から５００番のポリペプチドをコードするｃＤＮＡを、サイトメガロウイルスのプロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクターｐｃＤＮＡ３につなぎ、発現ベクターを作製した。

【００９９】

新規ヒトデルター２の発現ベクターを作製するにあたって、遺伝子産物のより安定的に発現させるために、開始コドン（配列表の配列番号４のＤＮＡ配列の２７７番）の５'方向に約２０ｂｐ上流の部分にＥｃｏＲＩサイトを付加した。すなわち、上記のＭｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔを用い、配列表の配列番号４に記載のＤＮＡ配列、新規ヒトデルター２の全長のｃＤＮＡを含むプラスミドｐＢＳＤＬ－２をテンプレートとし、配列表の配列番号１５及び配列番号１６の遺伝子配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、５'方向に約２０ｂｐ上流の部分にＥｃｏＲＩサイトを付加したＤＮＡを作成した。以下このプラスミドをｐＢＳＥｃｏ－ＤＬ－２と示す。

【０１００】

次に、このｐＢＳＥｃｏ－ＤＬ－２をテンプレートとして、細胞外部分のカルボキシル末端部分、すなわち配列表の配列番号２のアミノ酸配列の５００番目のセリン残基までをコードするＤＮＡ配列に続き、終止コドン、更に制限酵素ＮｏｔＩサイトを付加するため、同様にＭｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔを用い、配列表の配列番号１７及び配列番号１８の遺伝子配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、終止コドン、さらにＮｏｔＩサイトの付加を行った。次に、このベクターをＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩにて消化し、切り出されてくる約１６００ｂｐの遺伝子断片を同様な制限酵素処理したｐｃＤＮＡ３につないで発現ベクターを構築した。このベクターをｐＨＤ２ＥＸと命名した。

【０１０１】

２）分泌型新規ヒトデルター２のＦＬＡＧキメラ蛋白質（ＨＤ２ＥＸＦＬＡＧ）発現ベクター

配列表の配列番号２のアミノ酸配列の１番から５００番のポリペプチドのＣ末端にＦＬＡＧ配列をコードするｃＤＮＡを付加したキメラ蛋白質をコードするｃＤＮＡを、発現ベクターｐｃＤＮＡ３につなぎ、発現ベクターを作製した。

ｐＢＳＥｃｏ－ＤＬ－２をテンプレートとして用い、細胞外部分のカルボキシル末端部分、すなわち配列表の配列番号２の５００番目のセリン残基までをコードするＤＮＡ配列に続き、ＦＬＡＧ配列を付加し、ついで終止コドン、更に制限酵素ＮｏｔＩサイトを付加するため同様にＭｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔを用い、配列表の配列番号１９及び配列番号１８の遺伝子配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、Ｃ末端にＦＬＡＧ配列をコードする遺伝子並びに終止コドン、さらにＮｏｔＩサイトの付加を行った。次に、このベクターをＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩにて消化し、切り出されてくる約１６００ｂｐの遺伝子断片を同様な制限酵素処理したｐｃＤＮＡ３につないで発現ベクターを構築した。このベクターをｐＨＤ２ＥＸＦＬＡＧと命名した。

【０１０２】

３）分泌型新規ヒトデルター２のＩｇＧ１Ｆｃキメラ蛋白質（ＨＤ２ＥＸＩｇ）発現ベクター

配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドのＣ末にヒトＩｇＧ１のヒンジ部分以下のＦｃ部分のアミノ酸配列を付加したポリペプチドをコードする遺伝子配列をｐｃＤＮＡ３につなぎ、発現ベクターを作製した。

イムノグロブリンＦｃタンパクとの融合タンパクの作製はＺｅｔｔｌｍｅｉｓｓｌらの方法（Ｚｅｔｔｌｍｅｉｓｓｌ ｅｔ ａｌ．，ＤＮＡ ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，９，３４７

－３５４，１９９０）にしたがって、イントロンを含むゲノムＤＮＡを用いた遺伝子を利用し、その遺伝子をＰＣＲ法を用いて作製した。

【０１０３】

すなわち、ヒトゲノムＤＮＡをテンプレートとして使用して、ヒトＩｇＧ１Ｆｃ部分をコードするゲノム遺伝子配列を制限酵素ＢａｍＨＩサイトのついた配列表の配列番号２３の配列を有するオリゴヌクレオチド、制限酵素ＸｂａＩサイトのついた配列表の配列番号２４の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてＰＣＲを行う。その結果、得られるおよそ１．４Ｋｂｐのバンドを精製し、制限酵素ＢａｍＨＩ及びＸｂａｌ（共に日本国宝酒造社製）で消化して、同様な制限酵素処理を行ったｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔにＴ４　ＤＮＡリガーゼにて遺伝子をつないでサブクローニングした。

【０１０４】

その後、このプラスミドＤＮＡを精製し、シークエンスにて遺伝子配列を確認し、遺伝子配列が確かにヒトＩｇＧ１の重鎖のヒンジ部分からＣ末端にあたるアミノ酸配列をコードするゲノムＤＮＡであることを確認した（その配列はＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＮＩＨ　ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ９１－３２４２、１９９１を参照のこと）。すなわち、この遺伝子は５'端に制限酵素ＢａｍＨＩサイトを有し、３'端にＸｂａＩサイトを有し、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＫＳのＢａｍＨＩサイトとＸｂａＩサイトにクローニングされている。以下、このプラスミドをｐＢＳｈＩｇＦｃとする。

【０１０５】

ｐＢＳＥｃｏ－ＤＬ－２をテンプレートとして用い、同様にＭｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔを用い、細胞外部分のカルボキシル末端部分、すなわち配列表の配列番号３の５００番目のセリン残基の後に、制限酵素ＢａｍＨＩサイトを付加し、さらにその下流に上記のヒトイムノグロブリンＩｇＧ１ＦｃをコードするＤＮＡをつなぐためのＮｏｔＩサイトを付加するために、配列表の配列番号２０と配列番号１８のオリゴヌクレオチドにて、同様にＭｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔを用い、これらのサイトの付加を行った。また、この際にはＢａｍＨＩサイトの付加によりアミノ酸をコードするフレームがずれないように、配列表の配列番号４のＤＮＡ配列上の５００番目のセリンをコードするＤＮＡ配列はＡＧＣからＴＣＧに変更した。

【０１０６】

この様にして作製したベクターをＮｏｔＩ、ＢａｍＨＩにて消化し、上記のｐＢＳｈＩｇＦｃをＮｏｔＩ、ＢａｍＨＩにて消化し切り出されてくる約１２００ｂｐの遺伝子断片をつないで最終的に目的の分泌型新規ヒトデルター２のＩｇＧ１Ｆｃキメラ蛋白質をコードする遺伝子断片を含むベクターを作成した。最後に、このベクターをＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩにて消化し、切り出されてくる約３０００ｂｐの遺伝子断片を同様な制限酵素処理したｐｃＤＮＡ３につないで発現ベクターを構築した。このベクターをｐＨＤ２ＥＸＩｇと命名した。

【０１０７】

４）全長型ヒトデルター２の蛋白質（ＨＤ２Ｆ）発現ベクター

配列表の配列番号４のアミノ酸配列の１番から６５９番のポリペプチドをコードするｃＤＮＡを、発現ベクターｐｃＤＮＡ３につなぎ、発現ベクターを作製した。

ｐＢＳＥｃｏ－ＤＬ－２をテンプレートとして用い、全長のカルボキシル末端部分、すなわち配列表の配列番号３の６５９番目のバリンの後に終止コドン、更に制限酵素ＮｏｔＩサイトを付加するため同様にＭｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔを用い、配列表の配列番号２１及び配列番号１８の遺伝子配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、Ｃ末端に終止コドン、さらにＮｏｔＩサイトの付加を行った。次に、このベクターをＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩにて消化し、切り出されてくる約２１００ｂｐの遺伝子断片を同様な制限酵素処理したｐｃＤＮＡ３につないで発現ベクターを構築した。このベクターをｐＨＤ２Ｆと命名した。

【０１０８】

５）全長型新規ヒトデルター２のＦＬＡＧキメラ蛋白質（ＨＤ２ＦＬＡＧ）発現ベクター
配列表の配列番号３のアミノ酸配列の１番から６５９番のポリペプチドのＣ末端にＦＬＡＧ配列をコードするｃＤＮＡを付加したキメラ蛋白質をコードするｃＤＮＡを、発現ベクターｐｃＤＮＡ３につなぎ、発現ベクターを作製した。

ｐＢＳＥｃｏ－ＤＬ－２をテンプレートとして、カルボキシル末端部分にＦＬＡＧ配列を付加し、ついで終止コドン、更に制限酵素ＮｏｔＩサイトを付加するため同様に配列表の配列番号２２及び配列番号１８の遺伝子配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、Ｃ末端にＦＬＡＧ配列をコードする遺伝子並びに終止コドン、さらにＮｏｔＩサイトの付加を行った。

次に、このベクターをＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩにて消化し、切り出されてくる約２１００ｂｐの遺伝子断片を同様な制限酵素処理したｐｃＤＮＡ３につないで発現ベクターを構築した。このベクターをｐＨＤ２ＦＬＡＧと命名した。

【０１０９】

実施例４　各種発現ベクターの細胞への遺伝子導入と発現

実施例３で作製した発現ベクターはＣＯＳ－７細胞（理化学研究所、細胞開発銀行から入手可能、ＲＣＢ０５３９）に遺伝子導入した。

【０１１０】

遺伝子導入前の細胞の培養はＤ－ＭＥＭ（ダルベッコ改変ＭＥＭ培地、米国ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬ社製）１０％ＦＣＳにて培養した。遺伝子導入の前日に細胞の培地を交換し、細胞数を５×１０５ｃｅｌｌｓ／ｍｌにして一晩培養した。遺伝子導入の当日、遠心分離にて細胞を沈澱させ、ＰＢＳ（－）にて２回遠心洗浄後、１ｍＭ ＭｇＣｌ２、ＰＢＳ（－）に１×１０７ｃｅｌｌｓ／ｍｌとなるようにして細胞を調製した。遺伝子導入は米国Ｂｉｏ－Ｒａｄ社製遺伝子導入装置ジーンパルサーを用いたエレクトロポレーション法で行った。上記の細胞懸濁液を５００μｌエレクトロポレーション専用セル（０．４ｃｍ）に取り、発現ベクターを２０μｇ加え、氷中で５分間放置した。その後、３μＦ，４５０Ｖの条件で２回電圧をかけ、その２回の間は１分間室温で放置した。その後、氷中で５分間放置後、上記の培地１０ｍｌをあらかじめ分注した直径１０ｃｍ細胞培養用ディシュに細胞を播種し、３７℃、５％炭酸ガスインキュベーターで培養した。

【０１１１】

その翌日、培養上清を除去し、ディッシュに付着した細胞をＰＢＳ（－）１０ｍｌで２回洗浄し、発現ベクターｐＨＤ２ＥＸ、ｐＨＤ２ＥＸＦＬＡＧ、及びｐＨＤ２ＥＸＩｇの場合は無血清のＤ－ＭＥＭ１０ｍｌを加えてさらに７日間培養し、培養上清を回収し、セントリコン３０（米国アミコン社製）にてバッファーをＰＢＳ（－）に置換すると同時に１０倍濃縮を行い、細胞培養上清を得た。

【０１１２】

また、ｐＨＤ２Ｆ及ひｐＨＤ２ＦＬＡＧの場合は、１０％ＦＣＳを含むＤ－ＭＥＭに培地を交換し、さらに３日間培養し、細胞破砕物を調製した。すなわち、２×１０６個の細胞をセルリシスバッファー（５０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．５）、１％ ＴｒｉｔｏｎＸ１００、１０％ グリセロール、４ｍＭ ＥＤＴＡ、５０μｇ／ｍｌ Ａｐｒｏｔｉｎｉｎ、１００μＭ Ｌｅｕｐｅｐｔｉｎ、２５μＭ ＰｅｐｓｔａｔｉｎＡＮ １ｍＭ ＰＭＳＦ）２００μｌに懸濁し、氷中に２０分間放置し、その後１４０００ｒｐｍで２０分間遠心し上清を取り細胞破砕物を得た。

【０１１３】

こうして得られたサンプルを用いてウェスタンブロッティング法にて蛋白の発現を確認した。

すなわち、濃縮した培養上清もしくは細胞破砕物を日本国ＡＣＩジャパン社製のＳＤＳ－ＰＡＧＥ用電気泳動槽及びＳＤＳ－ＰＡＧＥ用ポリアクリルアミドゲル（グラジエントゲル５～２０％）を用い、添付の取扱い説明書に従ってＳＤＳ－ＰＡＧＥをおこなった。サンプルは２－メルカプトエタノール（２－ＭＥ）を加えて５分間の沸騰水浴加熱処理により還元処理を行ったものと、この処理を行わない非還元状態のものを用い、マーカーと

しては米国Ａｍｅｒｓｈａｍ社製レインボーマーカー（高分子量用）を用い、サンプルバッファー、泳動バッファーについては添付の取扱い説明書に従って作製した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ終了後、アクリルアミドゲルをＰＶＤＦメンブランフィルター（米国ＢｉｏＲａｄ社製）に同社製ミニトランスブロットセルにより転写した。

【０１１４】

このように作製されたフィルターをブロックエース（日本国大日本製薬社製）、もしくは５％牛由来アルブミン（米国シグマ社製）を含むＴＢＳ－Ｔ（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ、１３７ｍＭ ＮａＣｌ（ｐＨ７．６）、０．１％Ｔｗｅｅｎ ２０）に４℃一晩振盪してブロッキングした。その後、ＥＣＬウェスタンブロッティング検出システム（米国Ａｍｅｒｓｈａｍ社）に添付の説明書に従い、実施例６に記載した抗新規ヒトデルター２マウスモノクローナル抗体、もしくはＦＬＡＧキメラの場合（ＨＤ２ＥＸＦＬＡＧ、ＨＤ２ＦＬＡＧ）は一次抗体としてマウスモノクローナル抗体Ａｎｔｉ－ＦＬＡＧ Ｍ２（米国コダック社製）を用い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスＩｇ羊抗体（米国Ａｍｅｒｓｈａｍ社製）を反応させた。また、ＩｇＧキメラの場合（ＨＤ２ＥＸＩｇ）は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトＩｇヒツジ抗体（米国Ａｍｅｒｓｈａｍ社製）を反応させた。

【０１１５】

抗体の反応時間は各々室温で一時間反応させ、各反応間はＴＢＳ－Ｔにて１０分間室温で振盪洗浄する操作を３回ずつ繰り返した。最後の洗浄後、フィルターをＥＣＬウエスタンブロッティング検出システム（米国Ａｍｅｒｓｈａｍ社製）の反応液に５分間浸し、ポリ塩化ビニリデンラップに包んでＸ線フィルムに感光させた。

【０１１６】

その結果、還元処理を行ったサンプルはｐＨＤ２ＥＸとｐＨＤ２ＥＸＦＬＡＧの導入によって得られた蛋白質は約６５ｋダルトン、ｐＨＤ２ＥＸＩｇの導入によって得られた蛋白質は約９５ｋダルトン、一方、非還元状態のサンプルはｐＨＤ２ＥＸＩｇを導入した場合、１５０ｋから２００ｋダルトンの若干スメア状のバンドで主に約１８０ｋダルトンのバンドを検出し、還元条件のほぼ２倍の分子量であることから、２量体が形成されていることを確認した。

【０１１７】

これらの実験では、コントロールとしてインサートのないｐｃＤＮＡ３ベクターを導入したＣＯＳ－７細胞の細胞破砕物および培養上清を同様に試験したが、抗ヒトデルター２マウスモノクローナル抗体、抗ＦＬＡＧ抗体、抗ヒトＩｇ抗体に反応するバンドは検出されなかった。

以上の結果から、これら５種の発現ベクターはいずれも目的のポリペプチドを生産することができた。

【０１１８】

実施例５　遺伝子導入細胞による分泌型新規ヒトデルター２蛋白質の精製

実施例４の方法で発現が検出されたＨＤ２ＥＸＦＬＡＧもしくはＨＤ２ＥＸＩｇを含むＣＯＳ－７細胞培養上清を大量調製し、アフィニティーカラムによってこれらキメラ蛋白質を精製した。

ＨＤ２ＥＸＦＬＡＧに関しては、実施例４に記載した方法によって取得した２リットルの培養上清をＡｎｔｉ－ＦＬＡＧ Ｍ２ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｇｅｌ（米国コダック社製）を充填したカラムに通して、キメラ蛋白質が有するＦＬＡＧ配列とゲルのＡｎｔｉ－ＦＬＡＧ抗体のアフィニティーによりキメラ蛋白質をカラムに吸着させた。カラムは内径１０ｍｍのディスポカラム（米国ＢｉｏＲａｄ社製）を用い、上記ゲルを５ｍ１充填した。吸着は培地ボトル→カラム→ペリスターポンプ→培地ボトルの環流式回路を組み立て、流速１ｍｌ／分で７２時間循環させた。その後、カラムをＰＢＳ（－）３５ｍｌで洗浄し、０．５ＭＴｒｉｓ－グリシン（ｐＨ３．０）５０ｍ１で溶出した。あらかじめ小チューブ（米国ファルコン社製２０６３）に0．５ＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９．５）を２００μｌ分注しておき、溶出液は２ｍｌずつ２５画分をそのチューブに分取し、各々の画分を中和した。

【０１１９】
上記の方法で精製された分泌型ＦＬＡＧキメラ蛋白質の溶出画分の各１０μｌは実施例４に記載の還元処理を行い、５－２０％濃度勾配ポリアクリルアミドゲルによるＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動を行い、電気泳動終了後、日本国和光純薬社製ワコー銀染キットＩＩを用いて、添付の説明書に従って銀染色を行った。結果として、ＨＤ２ＥＸＦＬＡＧは第４番から第８番の溶出画分にバンドが検出され、この分子量は実施例４で得られた抗ＦＬＡＧ抗体によるウェスタンブロッティングの結果と一致した。この結果からＨＤ２ＥＸＦＬＡＧの純品が精製された。
【０１２０】
ＩｇＧ１Ｆｃキメラ蛋白質、すなわちＨＤ２ＥＸＩｇに関しては、ＦＬＡＧキメラ蛋白質と同様の操作で培養上清の２リットルをスウェーデン国ファルマシア社製Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａセファロースカラムに吸着させ、溶出画分を分取した。
ＦＬＡＧキメラ蛋白質と同様に溶出液の一部を用いて、還元条件でのＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動および銀染色により溶出画分の決定、サイズの確認、純度検定を行った。結果として、溶出画分の第４番から第１５番にバンドが検出され、サイズは抗ヒトＩｇ抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果と一致した。この結果からＨＤ２ＥＸＩｇの純品が精製された。
【０１２１】
このようにして精製されたＨＤ２ＥＸＦＬＡＧの分子量をさらに詳細にＳＤＳ－ＰＡＧＥにて解析したところ、その分子量は２つのバンドとして確認され、１つは６５．８Ｋダルトン、もう一つは６１．７Ｋダルトンであった。この２種の分子量の異なるバンドを実施例４に記載の方法でＰＶＤＦに転写して、米国ＡＢＩ社アミノ酸シークエンサーにてそれぞれのＮ末端のアミノ酸配列を１０アミノ酸決定した。その結果、いずれも配列表の配列番号１のアミノ酸配列の１番から１０番までにアミノ酸配列に一致した。このことからこの分子量の違いは糖鎖の付加の違いであると考えられた。同様に精製されたＨＤ２ＥＸＩｇにおいてもわずかに分子量が異なる２つのバンドが確認され、同様な理由によると考えられた。
【０１２２】
実施例６ 新規ヒトデルター２を認識する抗体作成
実施例８に記載の方法で精製されたＨＤ２ＥＸＦＬＡＧを免疫原としてウサギに免疫して、抗体価の測定後、全血の採血を行い、血清を採取して、米国ＢｉｏＲａｄ社製のエコノパック血清ＩｇＧ精製キットを用いて、添付の取扱い説明書に従って、抗新規ヒトデルター２ウサギポリクローナル抗体を作製した。
また、実施例５に記載した方法で精製されたＨＤ２ＥＸＦＬＡＧを免疫原として、成書の方法に従いマウスモノクローナル抗体を作成した。すなわち、上記のように精製されたＨＤ２ＥＸＦＬＡＧをＢａｌｂ／ｃマウス（日本国日本エスエルシー社製）に１匹あたり１０μｇを皮下・皮内に免疫した。２回の免疫後、眼底採血を行い血清中の抗体価の上昇を認めた後、３回目の免疫を行ってからマウスの脾臓細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞株Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８（ＡＴＣＣ ＴＩＢ９）とポリエチレングリコール法にて細胞融合を行った。ＨＡＴ培地（日本国免疫生物研究所製）にてハイブリドーマを選択し、酵素抗体法にて新規ヒトデルター２の細胞外部分を認識する抗体を培地中に産生しているハイブリドーマ株を分離し、新規ヒトデルター２を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ産生株が樹立された。
【０１２３】
このようにして樹立されたハイブリドーマの培養上清をスウェーデン国ファルマシア社製Ｍａｂ ＴｒａｐＧ ＩＩを用いて、添付の取扱い説明書に従って、抗新規ヒトデルター２モノクローナル抗体を精製し作製した。
これらモノクローナル抗体を用いてアフィニティーカラムを作製した。アフィニティーカラムの作製はスウェーデン国ファルマシア社製ＣＮＢｒ活性化Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ４Ｂにて添付の取扱い説明書に従い行った。このゲルの２ｍｌを用いて２ｃｍ２×１ｃｍのサ

イズのカラムを作製した。

【０１２４】

抗新規ヒトデルター２モノクローナル抗体を結合させたカラムに対してｐＨＤＥＸを遺伝子導入したＣＯＳ－７細胞培養上清濃縮液を２０ｍｌ／ｈｒの速度で流し、その後同一速度でＰＢＳ（－）を１５ｍｌ流して洗浄し、最終的に０．１Ｍ酢酸ナトリウム、０．５ＭＮａＣｌ（ＰＨ４．０）にて溶出した。この溶離液を１ｍｌづつ分取し、各画分に１ＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９．５）を２００μｌづつ加えて、中和した。

さらに実施例４に記載の方法に従って、各々の精製蛋白質を還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、銀染色、及びウェスタンブロッティングを行ない、分子量の推定を行った。

この結果、ｐＨＤＥＸを遺伝子導入したＣＯＳ－７細胞培養上清濃縮液からは約６５ｋダルトンのＨＤ２ＥＸが精製されていることが確認され、これらアフィニティーカラムで新規ヒトデルター２タンパク質が精製可能であることが明らかとなった。

【０１２５】

実施例７　ＨＤ２ＥＸＩｇの血液未分化細胞のコロニー形成に対する作用

ＨＤ２ＥＸＩｇの血液未分化細胞に対する生理作用を観察するため、ＣＤ３４陽性細胞をＨＤ２ＥＸＩｇおよび既存のサイトカイン存在下で無血清半固形培地で培養し、コロニー形成細胞の増減を観察した。

ヒト臍帯血もしくはヒト正常骨髄血のＣＤ３４陽性細胞は臍帯血もしくは成人正常骨髄血をシリカ液（日本国免疫生物研究所製）により添付の説明書にしたがって処理し、その後フィコールパック（スエーデン国ファルマシア社製）による比重遠心分離法により低密度細胞画分（＜１．０７７ｇ／ｍｌ）を分画した単核球より分離した。

【０１２６】

ＣＤ３４陽性細胞の分離はノルウェー国Ｄｙｎａｌ社製ＤｙｎａｂｅａｄｓＭ－４５０ ＣＤ３４とＤＥＴＡＣＨａＢＥＡＤＳ ＣＤ３４を用い、添付の取扱説明書に従って分離した。分離後、その純度はＦＩＴＣ標識抗ＣＤ３４抗体ＨＰＣＡ２（米国ベクトンデッキンソン社製）で染色し、同社のフローサイトメーター（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ）にて検定し、８５％以上の純度を有していることを確認して用いた。

このようにして分離したＣＤ３４陽性細胞４００個が下記の培地１ｍｌ中に存在するように均一に懸濁し、３５ｍｍディッシュ（米国ファルコン社製）にまき、３７℃、５％炭酸ガス、５％酸素ガス、９０％窒素ガス、１００％湿度雰囲気下の炭酸ガスインキュベーターで２週間の培養後、形成された血球コロニーを倒立顕微鏡下で計測した。

【０１２７】

培養に用いた培地はα－ｍｅｄｉｕｍ（米国ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬ製）に２％Ｄｅｉｏｎｉｚｅｄ Ｂｏｖｉｎｅ Ｓｅｒｕｍ Ａ１ｂｕｍｉｎ（ＢＳＡ、米国Ｓｉｇｍａ社製）、１０μｇ／ｍｌ ヒトインスリン（米国Ｓｉｇｍａ社製）、２００μｇ／ｍｌ トランスフェリン（米国Ｓｉｇｍａ社製）、１０^{-6}Ｍ ２－メルカプトエタノール（日本国ナカライテスク社製）、１６０μｇ／ｍｌ ソイビーンレクチン（米国Ｓｉｇｍａ社製）、９６μｇ／ｍｌ コレステロール（米国Ｓｉｇｍａ社製）、０．９％メチルセルロース（日本国和光純薬社製）で行った。

上記の培地に、最終的に１μｇ／ｍｌの濃度となるように新規ヒトデルター２細胞外ＩｇキメラIg蛋白質（ＨＤ２ＥＸＩｇ）を加え、比較区にはＩｇＧＦｃ部分の影響を見るため、ヒトＩｇＧ１（米国Ａｔｈｅｎｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）を同濃度加えた。同時に加えたサイトカイン条件は１００ｎｇ／ｍｌのヒトＳＣＦ（米国Ｉｎｔｅｒｇｅｎ社製）、１０ｎｇ／ｍｌのヒトＩＬ－３（米国Ｉｎｔｅｒｇｅｎ社製）、１００ｎｇ／ｍｌのヒトＩＬ－６（米国Ｉｎｔｅｒｇｅｎ社製）である。

【０１２８】

その結果、比較区ではコロニー形成が細胞４００個当たり４２±５であったが、ＨＤ２ＥＸＩｇを加えた場合には２１±３と著明にコロニー形成が抑制を受けた。この結果から、本発明分子新規ヒトデルター２は血液未分化細胞に作用することが明らかとなった。

実施例８　無血清液体培養におけるＨＤ２ＥＸＩｇの血液未分化細胞のＬＴＣ －ＩＣに対

する作用　ＨＤ２ＥＸＩｇの液体培養での血液未分化細胞に対する生理作用を確認するため、臍帯血単核球ＣＤ３４陽性細胞をＨＤ２ＥＸＩｇ及び既存のサイトカイン存在下の無血清培養実験を行った。培養期間は２週間で２週間の間の現在最も未分化な血液細胞群と考えられるＬＴＣ－ＩＣの変化を確認した。

【０１２９】

この比較としてＨＤＥＸＩｇを加えない比較区及び本発明者がＷＯ９７／１９１７２において同様な試験に於いてＬＴＣ－ＩＣ活性を見出しているヒトデルター１のＩｇＧキメラ蛋白（ＨＤ１ＥＸＩｇ）を加えたＨＤ１ＥＸＩｇ区も行った。ＨＤ１ＥＸＩｇの作製はＷＯ９７／１９１７２に記載の方法で行った。

実施例７に記載した方法で分離した臍帯血単核球ＣＤ３４陽性細胞を１６２００個を下記の培地で２週間培養した。培養前区、ＨＤ２ＥＸＩｇ添加区、ＨＤ１ＥＸＩｇ添加区と比較区の４つの実験区に存在するＬＴＣ－ＩＣ数を計測した。

また、細胞数並びにコロニー形成細胞数も各区に於いて計測した。

【０１３０】

培養条件は基本培地としてα－ｍｅｄｉｕｍを用い、２％ＢＳＡ、１０μｇ／ｍｌヒトインシュリン、２００μｇ／ｍｌトランスフェリン、４０μｇ／ｍｌ低密度リポプロテイン、10^{-5}Ｍ ２－メルカプトエタノールを加え、更に１００ｎｇ／ｍｌヒトＳＣＦ、１０ｎｇ／ｍｌヒトＩＬ－３、１００ｎｇ／ｍｌヒトＩＬ－６を加えた培地を用いた。この培地にＨＤ２ＥＸＩｇ添加区には精製されたＨＤ２ＥＸＩｇを１μｇ／ｍｌ、ＨＤ１ＥＸＩｇ添加区には精製されたＨＤ１ＥＸＩｇを１μｇ／ｍｌ、比較区には前述のヒトＩｇＧ１を各々添加した。培地交換は週２回、半量を交換した。

【０１３１】

ＬＴＣ－ＩＣの測定はＳｕｔｈｅｒｌａｎｄらの方法（Ｂ１ｏｏｄ、７４、１５６３－、１９８９；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．、８７、３５８４－、１９９０）の方法に従って行った。具体的には本発明者のＷＯ９７／１９１７２にも記載されている。

【０１３２】

全細胞数は生細胞数をトリパンブルー（米国Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ社製）による色素法で顕微鏡下で計測し、コロニー形成細胞数は実施例７に示す方法で次の培地にて行った。その培地はα－ｍｅｄｉｕｍに３０％牛胎児血清（ＦＣＳ、日本国ＩＣＮバイオメディカルジャパン社製）、１％ＢＳＡ、10^{-5}Ｍ ２－メルカプトエタノール、０．９％メチルセルロース（日本国和光純薬社製）、１００ｎｇ／ｍｌヒトＳＣＦ、１０ｎｇ／ｍｌヒトＩＬ－３、１００ｎｇ／ｍｌヒトＩＬ－６、２Ｕ／ｍｌヒトＥＰＯ（日本国中外製薬社製）、１０ｎｇ／ｍｌヒトＧ－ＣＳＦ（米国Ｉｎｔｅｒｇｅｎ社製）を加えた物を用いた。

結果を第１表に示す。

【０１３３】

【表１】
第１表 本発明分子ヒトデルター２の液体培養に対する効果

	全細胞数	コロニー形成細胞	ＬＴＣ－ＩＣ
培養前区	１６２００	２５００	１５０
培養後			
比較区	４４５０００	２３０００	２．３
ＨＤ１ＥＸＩｇ区	３９５０００	１６７００	９．３
ＨＤ２ＥＸＩｇ区	４１８０００	１６０００	１６．２

【０１３４】
この結果からＨＤ２ＥＸＩｇはＬＴＣ－ＩＣ数を比較区に比べ維持する活性を有していることが明らかとなった。また、この活性は比較に用いたヒトデルター１よりも強いことが確認された。
【０１３５】
実施例９　ＨＤ２ＥＸＩｇの血液未分化細胞に対する結合及び分離
精製されたＨＤ２ＥＸＩｇを用いて、ヒトＴ細胞系血液細胞株Ｊｕｒｋａｔ及びヒト臍帯血単核球ＣＤ３４陽性細胞に対する結合を調べた。この結合実験に於いて実施例８同様比較として本発明者により同様な活性が確認されたヒトデルター１のＩｇＧキメラ蛋白（ＨＤ１ＥＸＩｇ）も比較で実験を行った。
Ｊｕｒｋａｔ細胞は１×１０^{6}個を２％ＦＣＳ、１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓを含むハンクス液（米国Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ社製）１００μｌに懸濁し、ＨＤ２ＥＸＩｇもしくはＨＤ１ＥＸＩｇもしくはヒトＩｇＧ１を１μｇ／ｍｌとなるように添加し４℃で３時間放置し、反応させせた。反応後、同様なハンクス液で遠心分離にて洗浄し、ＰＥ（フェコエリスリン）標識ヤギ抗ヒトＩｇＧモノクローナル抗体にを１μｇ／ｍｌ添加して、３０分間氷中で放置した。その後、同様なハンクス液で２回洗浄したのち、最終的に同様なハンクス液に懸濁して、解析に供した。
測定はフローサイトメーターＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ（米国ベクトンデッキンソン社）で行った。
結果を第２図に示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度である。上段は比較のＨＤ１ＥＸＩｇの結果を示し、下段は本発明のＨＤ２ＥＸＩｇの結果を示す。実線はＨＤ１ＥＸＩｇおよびＨＤ２ＥＸＩｇの結果であり、破線はヒトＩｇＧ１の比較区である。いずれもＪｕｒｋａｔ細胞に結合していることが観察された。また、その結合を見ると、蛍光強度の強さは上段のＨＤ１ＥＸＩｇに比べ、本発明のＨＤ２ＥＸＩｇの方が蛍光強度が強いことが認められる。その蛍光強度の平均値で約２倍程度の強い蛍光強度が得られる。この結果から、ＨＤ２ＥＸＩｇはＨＤ１ＥＸＩｇに比べ、Ｊｕａｋａｔ細胞に対して強い結合をすることが理解された。
【０１３６】
次に、同様な染色方法で実施例７の方法で分離されたヒト臍帯血単核球ＣＤ３４陽性細胞に対する結合を調べた。ただし、この場合は、ＦＩＴＣ標識抗ヒトＣＤ３４抗体ＨＰＣＡ－２（米国ベクトンデッキンソン社製）による染色も、上記の２次抗体標識時に同時に行い、データはＣＤ３４陽性、すなわちＦＩＴＣ陽性画分のみを示す。

その結果を第３図に示す。この結果、同様にＨＤ２ＥＸＩｇ、ＨＤ１ＥＸＩｇはＣＤ３４陽性細胞に結合し、その結合はＨＤ２ＥＸＩｇの方が２倍程度ＨＤ１ＥＸＩｇより強いことが示された。

また、ＨＤ２ＥＸＩｇで染色した同様の細胞をセルソータＦＡＣＳｖａｎｔａｇｅ（米国ベクトンデッキンソン社）にて添付の取扱説明書に従って、ＨＤ２ＥＸＩｇ陽性画分の細胞を分離した。

【０１３７】

実施例１０　新規ヒトデルター２発現細胞との共培養による血液未分化細胞に対する効果

実施例３で作製した全長型新規ヒトデルター２のＦＬＡＧキメラ蛋白質発現ベクターｐＨＤ２ＦＬＡＧをマウス細胞株Ｂａｌｂ３Ｔ３（理化学研究所細胞開発銀行ＲＣＢ０００５）に実施例４に記載した方法で遺伝子導入を行い、成書の方法に従ってＧ４１８（米国Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ社）によるセレクションを行って、クローンを得た。得たクローンを実施例４に記載した方法で全長型ヒトデルター２のＦＬＡＧキメラ蛋白質の発現を確認して、発現の確認できたクローンを用いて以下の実験を行った。このクローンをＢａｌｂ／ＨＤ２ＦＬＡＧとする。

【０１３８】

実施例７の方法て得た臍帯血単核球ＣＤ３４陽性細胞とＢａｌｂ／ＨＤ２ＦＬＡＧを共培養した。比較として遺伝子導入していないＢａｌｂ３Ｔ３との共培養も行った。
培養条件は １）遺伝子導入していないＢａｌｂ３Ｔ３、造血因子無し。
２）Ｂａｌｂ／ＨＤ２ＦＬＡＧ、造血因子無し。
３）遺伝子導入していないＢａｌｂ３Ｔ３、造血因子有り。
４）Ｂａｌｂ／ＨＤ２ＦＬＡＧ、造血因子有り。
で行った。

【０１３９】

培地はα－ｍｅｄｉｕｍに１０％ＦＣＳ、10^{-5}Ｍ ２－メルカプトエタノールを加えたものを用いた。造血因子添加区では１００ｎｇ／ｍｌヒトＳＣＦ、１０ｎｇ／ｍｌヒトＩＬ－３、１００ｎｇ／ｍｌヒトＩＬ－６を加えた。培養期間は２週間で行い、培地交換は週３回の半量を交換した。ヒト血液細胞と共培養する前に、前もって培養しておいた各Ｂａｌｂ３Ｔ３細胞には２５０ＫＶ ＰｅａｋのＸ線を照射して、細胞の増殖を押さえた。
培養前と１）から４）の試験区でのコロニー形成細胞数、ＬＴＣ－ＩＣ数を計測した。
その結果は下記のようになった。

【０１４０】

培養前では全細胞数２００００個でコロニー形成細胞数が３２００個、ＬＴＣ－ＩＣ数が２２０個であった。

１）ではコロニー形成細胞数、ＬＴＣ－ＩＣ数とも測定できない位少なかった。

２）ではコロニー形成細胞数は測定できないくらい少なかった。ＬＴＣ－ＩＣは１０５個であった。

３）ではコロニー形成細胞数は２６５００個、ＬＴＣ－ＩＣは９０個であった。

４）ではコロニー形成細胞数は３８０００個、ＬＴＣ－ＩＣは１２０個であった。

また、３）と４）のコロニー形成細胞の内訳を解析したところ、３）では顆粒球系のコロニーしか観察されなかったが、４）では赤芽球系も観察され、コロニー形成細胞数の差はこの赤芽球系コロニー数の違いによるもでのあることが判った。

【０１４１】

この結果から、Ｂａｌｂ／ＨＤ２ＦＬＡＧ細胞はコロニー形成、特に赤芽球系コロニーの増幅作用を有し、ＬＴＣ－ＩＣ維持作用も有していることが明らかとなった。この結果から、本ヒトデルター２発現ベクターを用いれば造血細胞維持活性を持つ細胞を作り出すことができることが明らかとなった。

【０１４２】

実施例１１　新規ヒトデルター２を固定化した器材の作製とその効果

実施例５にて作製されたＨＤ２ＥＸＩｇを固定化したセファロースゲルを作製した。セファロースゲルはスエーデン国ファルマシア社製ＣＮＢｒ活性化セファロースゲルを用い、添付の説明書にしたがってＨＤ２ＥＸＩｇを固定化した。

このように作製されたゲルと実施例７の方法で分離された請帯血単核球ＣＤ３４陽性細胞を１昼夜培養した。培養条件は実施例１０と同一の培地で、比較区としてＢＳＡを固定化した同セファロースゲルを作製し、同様の実験を行った。培養後、実施例８の方法でコロニー形成細胞数を測定した。その結果、ＨＤ２ＥＸＩｇを固定化したゲルではコロニー形成細胞がおよそ４割程度少なくなる現象が確認された。

したがって、本発明のヒトデルター２が固定化された器材は造血細胞に対して作用を有することが明らかになった。

【０１４３】

実施例１２　新規ヒトデルター２の血管内皮細胞増殖に及ぼす変化

血管内皮細胞は、日本国クラボウ社製の正常ヒト大動脈血管内皮細胞と正常ヒト肺動脈血管内皮細胞のそれぞれ４次継代培養細胞を用いた。細胞は、３次培養の継代時に組織培養用９６ウェルプレート（米国ファルコン社製）に５０００細胞数／ウェルずつ蒔き、日本国クラボウ社製のヒトリコンビナントＥＧＦを１０ｎｇ／ｍｌ，ヒトリコンビナントＦＧＦ－Ｂを５ｎｇ／ｍｌ各々含有する低血清血管内皮細胞増殖用培地（ＨｕＭｅｄｉａ－ＥＧ２、日本国クラボウ社製）中で培養し、その際、最終的に１μｇ／ｍｌの濃度となるように新規ヒトデルター２細胞外Ｉｇキメラ蛋白質（ＨＤ２ＥＸＩｇ）を加え、比較区にはＩｇＧＦｃ部分の影響を見るため、ヒトＩｇＧ１（米国Ａｔｈｅｎｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）を同濃度加えた。尚、対照はＨｕＭｅｄｉａ－ＥＧ２以外の添加蛋白質無しの条件で培養を行った。培養は３７℃，５％炭酸ガス，１００％湿度雰囲気下で３日間行った後に、細胞を計数した。

【０１４４】

血管内皮細胞の計数は、ＢｏｒｅｎｆｒｅｕｎｄとＰｕｅｒｎｅｒ（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　９（１），７－９，１９８４）によって開発された方法、すなわち、生体染色色素のｎｅｕｔｒａｌ　ｒｅｄ（３－ａｍｉｎｏ－７－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏ－２－ｍｅｔｈｙｌｐｈｅｎａｚｉｎｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ）が生きている細胞においてのみ原形質膜を通りリソソームに蓄積されることを利用したニューラルレッド法を原理とした日本国クラボウ社製のＮＲ試薬セットを用い、５４０ｎｍの吸光度は日本国日本インターメッド社製イムノリーダー（ＮＪ－２０００）で測定した。その結果、大動脈血管内皮細胞の場合は対照区では吸光度の値がＯｐｔｉｃａｌ　Ｄｅｎｓｉｔｙ（ＯＤ）として０．１８±０．０２であり、ヒトＩｇＧ１添加区ではほぼ同様な０．１７±０．０２であったが、ＨＤ２ＥＸＩｇ添加区では０．１１±０．０１でありと著明に少なかった。また、肺動脈血管内皮細胞の場合は対照区では０．１６±０．０２であり、ヒトＩｇＧ１添加区ではほぼ同様な０．１６±０．０１であったが、ＨＤ２ＥＸＩｇ添加区では０．０８±０．０１でありと著明に少なかった。これらの結果から、ＨＤ２ＥＸＩｇは血管内皮細胞の増殖を抑制することかわかった。

【０１４５】

実施例１３　薬剤の作製

実施例５に示された各ポリペプチド１ｍｇに対して人血清アルブミン（ミドリ十字社製）５ｍｇとなるように１ｍｌの蒸留水に溶解し、０．２２μｍの滅菌フィルターにて濾過滅菌後、バイアル瓶に分注して凍結乾燥して作製した。

【０１４６】

配列表

配列番号　：１

配列の長さ：１９１

配列の型　：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

　生物名：ヒト

配列

Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly
1 5 10 15

Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe
20 25 30

Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys
35 40 45

Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala
50 55 60

Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro
65 70 75 80

Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp
85 90 95

His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala
100 105 110

Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn
115 120 125

Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser
130 135 140

Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg

145 150 155 160

Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro

165 170 175

Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys

180 185 190 191

配列番号 ：2

配列の長さ：５００

配列の型 ：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト

配列

Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly

1 5 10 15

Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe

20 25 30

Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys

35 40 45

Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala

50 55 60

Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro

65 70 75 80

Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp

85 90 95

His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala

100 105 110

Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn
115 120 125
Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser
130 135 140
Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg
145 150 155 160
Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro
165 170 175
Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln
180 185 190
Gln Pro Ile Cys Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser
195 200 205
Lys Pro Ala Glu Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys
210 215 220
Asn Glu Cys Ile Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr
225 230 235 240
Pro Trp Gln Cys Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp
245 250 255
Gln Asp Leu Asn Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala
260 265 270
Thr Cys Ser Asn Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro
275 280 285
Gly Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser
290 295 300
Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr
305 310 315 320
His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser
325 330 335

Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg
340 345 350
Glu Arg Asn Gln Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe
355 360 365
Thr Gly Ser Asn Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro
370 375 380
Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys
385 390 395 400
Arg Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser
405 410 415
Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu
420 425 430
Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg
435 440 445
Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe
450 455 460
Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys
465 470 475 480
Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly
485 490 495
Leu Pro Pro Ser
500

配列番号 ：3
配列の長さ：６５９
配列の型 ：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト

配列

Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly
1 5 10 15
Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe
20 25 30
Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys
35 40 45
Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala
50 55 60
Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro
65 70 75 80
Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp
85 90 95
His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala
100 105 110
Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn
115 120 125
Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser
130 135 140
Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg
145 150 155 160
Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro
165 170 175
Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln
180 185 190
Gln Pro Ile Cys Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser

195 200 205

Lys Pro Ala Glu Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys

210 215 220

Asn Glu Cys Ile Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr

225 230 235 240

Pro Trp Gln Cys Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp

245 250 255

Gln Asp Leu Asn Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala

260 265 270

Thr Cys Ser Asn Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro

275 280 285

Gly Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser

290 295 300

Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr

305 310 315 320

His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser

325 330 335

Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg

340 345 350

Glu Arg Asn Gln Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe

355 360 365

Thr Gly Ser Asn Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro

370 375 380

Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys

385 390 395 400

Arg Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser

405 410 415

Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu

420 425 430
Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg
435 440 445
Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe
450 455 460
Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys
465 470 475 480
Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly
485 490 495
Leu Pro Pro Ser Phe Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu
500 505 510
Ala Val Leu Leu Val Leu Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln
515 520 525
Leu Arg Leu Arg Arg Pro Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn
530 535 540
Leu Ser Asp Phe Gln Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys
545 550 555 560
Asn Thr Asn Gln Lys Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys
565 570 575
Ser Asn Cys Gly Lys Gln Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala
580 585 590
Pro Gly Pro Leu Gly Arg Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser
595 600 605
Asp Lys Ser Leu Gly Glu Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys
610 615 620
Pro Glu Cys Arg Ile Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr
625 630 635 640
Gln Ser Val Cys Leu Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala

645 650 655

Thr Glu Val

659

配列番号 ：4

配列の長さ：３３３９

配列の型 ：核酸

鎖の数 ：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃＤＮＡ to ｍＲＮＡ

起源

生物名：ヒト

配列

```
                                                      GCCGCC TTGGTGCAGC    16
GTACACCGGC ACTAGCCCGC TTGCAGCCCC AGGATTAGAC AGAAGACGCG TCCTCGGCGC    76
GGTCGCCGCC CAGCCGTAGT CACCTGGATT ACCTACAGCG GCAGCTGCAG CGGAGCCAGC   136
GAGAAGGCCA AAGGGGAGCA GCGTCCCGAG AGGAGCGCCT CTTTTCAGGG ACCCCGCCGG   196
CTGGCGGACG CGCGGGAAAG CGGCGTCGCG AACAGAGCCA GATTGAGGGC CCGCGGGTGG   256
AGAGAGCGAC GCCCGAGGGG  ATG GCG GCA GCG TCC CGG AGC GCC TCT GGC     306
                       Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly
                       -26 -25                 -20
TGG GCG CTA CTG CTG CTG GTG GCA CTT TGG CAG CAG CGC GCG GCC GGC     354
Trp Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly
    -15                 -10                  -5              -1
TCC GGC GTC TTC CAG CTG CAG CTG CAG GAG TTC ATC AAC GAG CGC GGC     402
Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly
  1               5                  10                  15
GTA CTG GCC AGT GGG CGG CCT TGC GAG CCC GGC TGC CGG ACT TTC TTC     450
```

Val Leu Ala Ser Gly Arg Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe
20 25 30
CGC GTC TGC CTT AAG CAC TTC CAG GCG GTC GTC TCG CCC GGA CCC TGC 498
Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys
35 40 45
ACC TTC GGG ACC GTC TCC ACG CCG GTA TTG GGC ACC AAC TCC TTC GCT 546
Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala
50 55 60
GTC CGG GAC GAC AGT AGC GGC GGG GGG CGC AAC CCT CTC CAA CTG CCC 594
Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro
65 70 75 80
TTC AAT TTC ACC TGG CCG GGT ACC TTC TCG CTC ATC ATC GAA GCT TGG 642
Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp
85 90 95
CAC GCG CCA GGA GAC GAC CTG CGG CCA GAG GCC TTG CCA CCA GAT GCA 690
His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala
100 105 110
CTC ATC AGC AAG ATC GCC ATC CAG GGC TCC CTA GCT GTG GGT CAG AAC 738
Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn
115 120 125
TGG TTA TTG GAT GAG CAA ACC AGC ACC CTC ACA AGG CTG CGC TAC TCT 786
Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser
130 135 140
TAC CGG GTC ATC TGC AGT GAC AAC TAC TAT GGA GAC AAC TGC TCC CGC 834
Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg
145 150 155 160
CTG TGC AAG AAG CGC AAT GAC CAC TTC GGC CAC TAT GTG TGC CAG CCA 882
Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro

```
                165                 170                 175
GAT GGC AAC TTG TCC TGC CTG CCC GGT TGG ACT GGG GAA TAT TGC CAA     930
Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln
            180                 185                 190
CAG CCT ATC TGT CTT TCG GGC TGT CAT GAA CAG AAT GGC TAC TGC AGC     978
Gln Pro Ile Cys Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser
        195                 200                 205
AAG CCA GCA GAG TGC CTC TGC CGC CCA GGC TGG CAG GGC CGG CTG TGT    1026
Lys Pro Ala Glu Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys
    210                 215                 220
AAC GAA TGC ATC CCC CAC AAT GGC TGT CGC CAC GGC ACC TGC AGC ACT    1074
Asn Glu Cys Ile Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr
225                 230                 235                 240
CCC TGG CAA TGT ACT TGT GAT GAG GGC TGG GGA GGC CTG TTT TGT GAC    1122
Pro Trp Gln Cys Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp
                245                 250                 255
CAA GAT CTC AAC TAC TGC ACC CAC CAC TCC CCA TGC AAG AAT GGG GCA    1170
Gln Asp Leu Asn Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala
            260                 265                 270
ACG TGC TCC AAC AGT GGG CAG CGA AGC TAC ACC TGC ACC TGT CGC CCA    1218
Thr Cys Ser Asn Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro
        275                 280                 285
GGC TAC ACT GGT GTG GAC TGT GAG CTG GAG CTC AGC GAG TGT GAC AGC    1266
Gly Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser
    290                 295                 300
AAC CCC TGT CGC AAT GGA GGC AGC TGT AAG GAC CAG GAG GAT GGC TAC    1314
Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr
305                 310                 315                 320
```

CAC TGC CTG TGT CCT CCG GGC TAC TAT GGC CTG CAT TGT GAA CAC AGC 1362
His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser
325 330 335
ACC TTG AGC TGC GCC GAC TCC CCC TGC TTC AAT GGG GGC TCC TGC CGG 1410
Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg
340 345 350
GAG CGC AAC CAG GGG GCC AAC TAT GCT TGT GAA TGT CCC CCC AAC TTC 1458
Glu Arg Asn Gln Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe
355 360 365
ACC GGC TCC AAC TGC GAG AAG AAA GTG GAC AGG TGC ACC AGC AAC CCC 1506
Thr Gly Ser Asn Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro
370 375 380
TGT GCC AAC GGG GGA CAG TGC CTG AAC CGA GGT CCA AGC CGC ATG TGC 1554
Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys
385 390 395 400
CGC TGC CGT CCT GGA TTC ACG GGC ACC TAC TGT GAA CTC CAC GTC AGC 1602
Arg Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser
405 410 415
GAC TGT GCC CGT AAC CCT TGC GCC CAC GGT GGC ACT TGC CAT GAC CTG 1650
Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu
420 425 430
GAG AAT GGG CTC ATG TGC ACC TGC CCT GCC GGC TTC TCT GGC CGA CGC 1698
Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg
435 440 445
TGT GAG GTG CGG ACA TCC ATC GAT GCC TGT GCC TCG AGT CCC TGC TTC 1746
Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe
450 455 460
AAC AGG GCC ACC TGC TAC ACC GAC CTC TCC ACA GAC ACC TTT GTG TGC 1794

Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys
465 470 475 480
AAC TGC CCT TAT GGC TTT GTG GGC AGC CGC TGC GAG TTC CCC GTG GGC 1842
Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly
485 490 495
TTG CCG CCC AGC TTC CCC TGG GTG GCC GTC TCG CTG GGT GTG GGG CTG 1890
Leu Pro Pro Ser Phe Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu
500 505 510
GCA GTG CTG CTG GTA CTG CTG GGC ATG GTG GCA GTG GCT GTG CGG CAG 1938
Ala Val Leu Leu Val Leu Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln
515 520 525
CTG CGG CTT CGA CGG CCG GAC GAC GGC AGC AGG GAA GCC ATG AAC AAC 1986
Leu Arg Leu Arg Arg Pro Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn
530 535 540
TTG TCG GAC TTC CAG AAG GAC AAC CTG ATT CCT GCC GCC CAG CTT AAA 2034
Leu Ser Asp Phe Gln Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys
545 550 555 560
AAC ACA AAC CAG AAG AAG GAG CTG GAA GTG GAC TGT GGC CTG GAC AAG 2082
Asn Thr Asn Gln Lys Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys
565 570 575
TCC AAC TGT GGC AAA CAG CAA AAC CAC ACA TTG GAC TAT AAT CTG GCC 2130
Ser Asn Cys Gly Lys Gln Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala
580 585 590
CCA GGG CCC CTG GGG CGG GGG ACC ATG CCA GGA AAG TTT CCC CAC AGT 2178
Pro Gly Pro Leu Gly Arg Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser
595 600 605
GAC AAG AGC TTA GGA GAG AAG GCG CCA CTG CGG TTA CAC AGT GAA AAG 2226
Asp Lys Ser Leu Gly Glu Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys

610 615 620

CCA GAG TGT CGG ATA TCA GCG ATA TGC TCC CCC AGG GAC TCC ATG TAC 2274

Pro Glu Cys Arg Ile Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr

625 630 635 640

CAG TCT GTG TGT TTG ATA TCA GAG GAG AGG AAT GAA TGT GTC ATT GCC 2322

Gln Ser Val Cys Leu Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala

645 650 655

ACG GAG GTA 2331

Thr Glu Val

659

TAAGGCAGGA GCCTACCTGG ACATCCCTGC TCAGCCCCGC GGCTGGACCT TCCTTCTGCA 2391

TTGTTTACAT TGCATCCTGG ATGGGACGTT TTTCATATGC AACGTGCTGC TCTCAGGAGG 2451

AGGAGGGAAT GGCAGGAACC GGACAGACTG TGAACTTGCC AAGAGATGCA ATACCCTTCC 2511

ACACCTTTGG GTGTCTGTCT GGCATCAGAT TGGCAGCTGC ACCAACCAGA GGAACAGAAG 2571

AGAAGAGAGA TGCCACTGGG CACTGCCCTG CCAGTAGTGG CCTTCAGGGG GCTCCTTCCG 2631

GGGCTCCGGC CTGTTTTCCA GAGAGAGTGG CAGTAGCCCC ATGGGGCCCG GAGCTGCTGT 2691

GGCCTCCACT GGCATCCGTG TTTCCAAAAG TGCCTTTGGC CCAGGCTCCA CGGCGACAGT 2751

TGGGCCCAAA TCAGAAAGGA GAGAGGGGGC CAATGAGGGC AGGGCCTCCT GTGGGCTGGA 2811

AAACCACTGG GTGCGTCTCT TGCTGGGGTT TGCCCTGGAG GTGAGGTGAG TGCTCGAGGG 2871

AGGGGAGTGC TTTCTGCCCC ATGCCTCCAA CTACTGTATG CAGGCCTGGC TCTCTGGTCT 2931

AGGCCCTTTG GGCAAGAATG TCCGTCTACC CGGCTTCCAC CACCCTCTGG CCCTGGGCTT 2991

CTGTAAGCAG ACAGGCAGAG GGCCTGCCCC TCCCACCAGC CAAGGGTGCC AGGCCTAACT 3051

GGGGCACTCA GGGCAGTGTG TTGGAAATTC CACTGAGGGG GAAATCAGGT GCTGCGGCCG 3111

CCTGGGCCCT TTCCTCCCTC AAGCCCATCT CCACAACCTC GAGCCTGGGC TCTGGTCCAC 3171

TACTGCCCCA GACCACCCTC AAAGCTGGTC TTCAGAAATC AATAATATGA GTTTTTATTT 3231

TGTTTTTTTT TTTTTTTTTG TAGTTTATTT TGGAGTCTAG TATTTCAATA ATTTAAGAAT 3291

CAGAAGCACT GACCTTTCTA CATTTTATAA CATTATTTTG TATATAAT 3339

配列番号　：５
配列の長さ：２７
配列の型　：核酸
鎖の数　　：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）
配列
GAT TAT AAA GAT GAT GAT GAT AAA TGA 27
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5 8

配列番号　：６
配列の長さ：２０
配列の型　：核酸
鎖の数　　：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）
配列
TGGCARTGYA AYTGYCARGA 20

配列番号　：７
配列の長さ：２０
配列の型　：核酸
鎖の数　　：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）
配列
ATYTTYTTYT CRCARTTRAA 20

配列番号 ：８

配列の長さ：２６６３

配列の型 ：核酸

鎖の数 ：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃＤＮＡ to ｍＲＮＡ

起源

生物名：ヒト

配列

CTTGGGAA GAGGCGGAGA CCGGCTTTTA AAGAAAGAAG TCCTGGGTCC TGCGGTCTGG 58

GGCGAGGCAA GGGCGCTTTT CTGCCCACGC TCCCCGTGGC CCATCGATCC CCCGCGCGTC 118

CGCCGCTGTT CTAAGGAGAG AAGTGGGGGC CCCCCAGGCT CGCGCGTGGA GCGAAGCAGC 178

ATG GGC AGT CGG TGC GCG CTG GCC CTG GCG GTG CTC TCG GCC TTG CTG 226

Met Gly Ser Arg Cys Ala Leu Ala Leu Ala Val Leu Ser Ala Leu Leu

-20 -15 -10

TGT CAG GTC TGG AGC TCT GGG GTG TTC GAA CTG AAG CTG CAG GAG TTC 274

Cys Gln Val Trp Ser Ser Gly Val Phe Glu Leu Lys Leu Gln Glu Phe

-5 -1 1 5 10

GTC AAC AAG AAG GGG CTG CTG GGG AAC CGC AAC TGC TGC CGC GGG GGC 322

Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu Gly Asn Arg Asn Cys Cys Arg Gly Gly

15 20 25

GCG GGG CCA CCG CCG TGC GCC TGC CGG ACC TTC TTC CGC GTG TGC CTC 370

Ala Gly Pro Pro Pro Cys Ala Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu

30 35 40

AAG CAC TAC CAG GCC AGC GTG TCC CCC GAG CCG CCC TGC ACC TAC GGC 418

Lys His Tyr Gln Ala Ser Val Ser Pro Glu Pro Pro Cys Thr Tyr Gly

45 50 55

AGC GCC GTC ACC CCC GTG CTG GGC GTC GAC TCC TTC AGT CTG CCC GAC 466

Ser Ala Val Thr Pro Val Leu Gly Val Asp Ser Phe Ser Leu Pro Asp
60 65 70 75
GGC GGG GGC GCC GAC TCC GCG TTC AGC AAC CCC ATC CGC TTC CCC TTC 514
Gly Gly Gly Ala Asp Ser Ala Phe Ser Asn Pro Ile Arg Phe Pro Phe
80 85 90
GGC TTC ACC TGG CCG GGC ACC TTC TCT CTG ATT ATT GAA GCT CTC CAC 562
Gly Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Leu His
95 100 105
ACA GAT TCT CCT GAT GAC CTC GCA ACA GAA AAC CCA GAA AGA CTC ATC 610
Thr Asp Ser Pro Asp Asp Leu Ala Thr Glu Asn Pro Glu Arg Leu Ile
110 115 120
AGC CGC CTG GCC ACC CAG AGG CAC CTG ACG GTG GGC GAG GAG TGG TCC 658
Ser Arg Leu Ala Thr Gln Arg His Leu Thr Val Gly Glu Glu Trp Ser
125 130 135
CAG GAC CTG CAC AGC AGC GGC CGC ACG GAC CTC AAG TAC TCC TAC CGC 706
Gln Asp Leu His Ser Ser Gly Arg Thr Asp Leu Lys Tyr Ser Tyr Arg
140 145 150 155
TTC GTG TGT GAC GAA CAC TAC TAC GGA GAG GGC TGC TCC GTT TTC TGC 754
Phe Val Cys Asp Glu His Tyr Tyr Gly Glu Gly Cys Ser Val Phe Cys
160 165 170
CGT CCC CGG GAC GAT GCC TTC GGC CAC TTC ACC TGT GGG GAG CGT GGG 802
Arg Pro Arg Asp Asp Ala Phe Gly His Phe Thr Cys Gly Glu Arg Gly
175 180 185
GAG AAA GTG TGC AAC CCT GGC TGG AAA GGG CCC TAC TGC ACA GAG CCG 850
Glu Lys Val Cys Asn Pro Gly Trp Lys Gly Pro Tyr Cys Thr Glu Pro
190 195 200
ATC TGC CTG CCT GGA TGT GAT GAG CAG CAT GGA TTT TGT GAC AAA CCA 898
Ile Cys Leu Pro Gly Cys Asp Glu Gln His Gly Phe Cys Asp Lys Pro

205 210 215

GGG GAA TGC AAG TGC AGA GTG GGC TGG CAG GGC CGG TAC TGT GAC GAG 946

Gly Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu

220 225 230 235

TGT ATC CGC TAT CCA GGC TGT CTC CAT GGC ACC TGC CAG CAG CCC TGG 994

Cys Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp

240 245 250

CAG TGC AAC TGC CAG GAA GGC TGG GGG GGC CTT TTC TGC AAC CAG GAC 1042

Gln Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp

255 260 265

CTG AAC TAC TGC ACA CAC CAT AAG CCC TGC AAG AAT GGA GCC ACC TGC 1090

Leu Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys

270 275 280

ACC AAC ACG GGC CAG GGG AGC TAC ACT TGC TCT TGC CGG CCT GGG TAC 1138

Thr Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr

285 290 295

ACA GGT GCC ACC TGC GAG CTG GGG ATT GAC GAG TGT GAC CCC AGC CCT 1186

Thr Gly Ala Thr Cys Glu Leu Gly Ile Asp Glu Cys Asp Pro Ser Pro

300 305 310 315

TGT AAG AAC GGA GGG AGC TGC ACG GAT CTC GAG AAC AGC TAC TCC TGT 1234

Cys Lys Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Ser Cys

320 325 330

ACC TGC CCA CCC GGC TTC TAC GGC AAA ATC TGT GAA TTG AGT GCC ATG 1282

Thr Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Ile Cys Glu Leu Ser Ala Met

335 340 345

ACC TGT GCG GAC GGC CCT TGC TTT AAC GGG GGT CGG TGC TCA GAC AGC 1330

Thr Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Ser

350 355 360

CCC GAT GGA GGG TAC AGC TGC CGC TGC CCC GTG GGC TAC TCC GGC TTC 1378
Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Cys Arg Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Phe
365 370 375

AAC TGT GAG AAG AAA ATT GAC TAC TGC AGC TCT TCA CCC TGT TCT AAT 1426
Asn Cys Glu Lys Lys Ile Asp Tyr Cys Ser Ser Ser Pro Cys Ser Asn
380 385 390 395

GGT GCC AAG TGT GTG GAC CTC GGT GAT GCC TAC CTG TGC CGC TGC CAG 1474
Gly Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asp Ala Tyr Leu Cys Arg Cys Gln
400 405 410

GCC GGC TTC TCG GGG AGG CAC TGT GAC GAC AAC GTG GAC GAC TGC GCC 1522
Ala Gly Phe Ser Gly Arg His Cys Asp Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala
415 420 425

TCC TCC CCG TGC GCC AAC GGG GGC ACC TGC CGG GAT GGC GTG AAC GAC 1570
Ser Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Gly Val Asn Asp
430 435 440

TTC TCC TGC ACC TGC CCG CCT GGC TAC ACG GGC AGG AAC TGC AGT GCC 1618
Phe Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Ser Ala
445 450 455

CCC GTC AGC AGG TGC GAG CAC GCA CCC TGC CAC AAT GGG GCC ACC TGC 1666
Pro Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys
460 465 470 475

CAC GAG AGG GGC CAC CGC TAT GTG TGC GAG TGT GCC CGA GGC TAC GGG 1714
His Glu Arg Gly His Arg Tyr Val Cys Glu Cys Ala Arg Gly Tyr Gly
480 485 490

GGT CCC AAC TGC CAG TTC CTG CTC CCC GAG CTG CCC CCG GGC CCA GCG 1762
Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Leu Pro Pro Gly Pro Ala
495 500 505

GTG GTG GAC CTC ACT GAG AAG CTA GAG GGC CAG GGC GGG CCA TTC CCC 1810

Val Val Asp Leu Thr Glu Lys Leu Glu Gly Gln Gly Gly Pro Phe Pro
510 515 520

TGG GTG GCC GTG TGC GCC GGG GTC ATC CTT GTC CTC ATG CTG CTG CTG 1858
Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Ile Leu Val Leu Met Leu Leu Leu
525 530 535

GGC TGT GCC GCT GTG GTG GTC TGC GTC CGG CTG AGG CTG CAG AAG CAC 1906
Gly Cys Ala Ala Val Val Val Cys Val Arg Leu Arg Leu Gln Lys His
540 545 550 555

CGG CCC CCA GCC GAC CCC TGC CGG GGG GAG ACG GAG ACC ATG AAC AAC 1954
Arg Pro Pro Ala Asp Pro Cys Arg Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn
560 565 570

CTG GCC AAC TGC CAG CGT GAG AAG GAC ATC TCA GTC AGC ATC ATC GGG 2002
Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Ile Ser Val Ser Ile Ile Gly
575 580 585

GCC ACG CAG ATC AAG AAC ACC AAC AAG AAG GCG GAC TTC CAC GGG GAC 2050
Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp
590 595 600

CAC AGC GCC GAC AAG AAT GGC TTC AAG GCC CGC TAC CCA GCG GTG GAC 2098
His Ser Ala Asp Lys Asn Gly Phe Lys Ala Arg Tyr Pro Ala Val Asp
605 610 615

TAT AAC CTC GTG CAG GAC CTC AAG GGT GAC GAC ACC GCC GTC AGG GAC 2146
Tyr Asn Leu Val Gln Asp Leu Lys Gly Asp Asp Thr Ala Val Arg Asp
620 625 630 635

GCG CAC AGC AAG CGT GAC ACC AAG TGC CAG CCC CAG GGC TCC TCA GGG 2194
Ala His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Pro Gln Gly Ser Ser Gly
640 645 650

GAG GAG AAG GGG ACC CCG ACC ACA CTC AGG GGT GGA GAA GCA TCT GAA 2242
Glu Glu Lys Gly Thr Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ala Ser Glu

655 660 665

AGA AAA AGG CCG GAC TCG GGC TGT TCA ACT TCA AAA GAC ACC AAG TAC 2290

Arg Lys Arg Pro Asp Ser Gly Cys Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr

670 675 680

CAG TCG GTG TAC GTC ATA TCC GAG GAG AAG GAT GAG TGC GTC ATA GCA 2338

Gln Ser Val Tyr Val Ile Ser Glu Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala

685 690 695

ACT GAG GTG 2347

Thr Glu Val

700

TAAAATGGAA GTGAGATGGC AAGACTCCCG TTTCTCTTAA AATAAGTAAA ATTCCAAGGA 2407

TATATGCCCC AACGAATGCT GCTGAAGAGG AGGGAGGCCT CGTGGACTGC TGCTGAGAAA 2467

CCGAGTTCAG ACCGAGCAGG TTCTCCTCCT GAGGTCCTCG ACGCCTGCCG ACAGCCTGTC 2527

GCGGCCCGGC CGCCTGCGGC ACTGCCTTCC GTGACGTCGC CGTTGCACTA TGGACAGTTG 2587

CTCTTAAGAG AATATATATT TAAATGGGTG AACTGAATTA CGCATAAGAA GCATGCACTG 2647

CCTGAGTGTA TATTTT 2663

配列番号 ：９

配列の長さ：２０

配列の型 ：核酸

鎖の数 ：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

TGACGGTGGG CGAGGAGTGG 20

配列番号 ：１０

配列の長さ：２０

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

GCAGCTGTAC CCTCCATCGG 20

配列番号　：１１

配列の長さ：７１６

配列の型　：核酸

鎖の数　　：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃＤＮＡ　to　ｍＲＮＡ

起源：ヒト

配列

TGACGGTGGG CGAGGAGTGG TCCCAGGACC TGCACAGCAG CGGCCGCACG GACCTCAAGT 60
ACTCCTACCG CTTCGTGTGT GACGAACACT ACTACGGAGA GGGCTGCTCC GTTTTCTGCC 120
GTCCCCGGGA CGATGCCTTC GGCCACTTCA CCTGTGGGGA GCGTGGGGAG AAAGTGTGCA 180
ACCCTGGCTG GAAAGGGCCC TACTGCACAG AGCCGATCTG CCTGCCTGGA TGTGATGAGC 240
AGCATGGATT TTGTGACAAA CCAGGGGAAT GCAAGTGCAG AGTGGGCTGG CAGGGCCGGT 300
ACTGTGACGA GTGTATCCGC TATCCAGGCT GTCTCCATGG CACCTGCCAG CAGCCCTGGC 360
AGTGCAACTG CCAGGAAGGC TGGGGGGGCC TTTTCTGCAA CCAGGACCTG AACTACTGCA 420
CACACCATAA GCCCTGCAAG AATGGAGCCA CCTGCACCAA CACGGGCCAG GGGAGCTACA 480
CTTGCTCTTG CCGGCCTGGG TACACAGGTG CCACCTGCGA GCTGGGGATT GACGAGTGTG 540
ACCCCAGCCC TTGTAAGAAC GGAGGGAGCT GCACGGATCT CGAGAACAGC TACTCCTGTA 600
CCTGCCCACC CGGCTTCTAC GGCAAAATCT GTGAATTGAG TGCCATGACC TGTGCGGACG 660
GCCCTTGCTT TAACGGGGGT CGGTGCTCAG ACAGCCCCGA TGGAGGGTAC AGCTGC 716

配列番号　：１２
配列の長さ：２０
配列の型　：核酸
鎖の数　　：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）
配列
TTGGGCACCA ACTCCTTCGC 20

配列番号　：１３
配列の長さ：２０
配列の型　：核酸
鎖の数　　：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）
配列
TAGGCTGTTG GCAATATTCC 20

配列番号　：１４
配列の長さ：４１２
配列の型　：核酸
鎖の数　　：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ｃＤＮＡ ｔｏ ｍＲＮＡ
起源：ヒト
配列
TTGGGCACCA ACTCCTTCGC TGTCCGGGAC GACAGTAGCG GCGGGGGGCG CAACCCTCTC 60
CAACTGCCCT TCAATTTCAC CTGGCCGGGT ACCTTCTCGC TCATCATCGA AGCTTGGCAC 120

GCGCCAGGAG ACGACCTGCG GCCAGAGGCC TTGCCACCAG ATGCACTCAT CAGCAAGATC 180

GCCATCCAGG GCTCCCTAGC TGTGGGTCAG AACTGGTTAT TGGATGAGCA AACCAGCACC 240

CTCACAAGGC TGCGCTACTC TTACCGGGTC ATCTGCAGTG ACAACTACTA TGGAGACAAC 300

TGCTCCCGCC TGTGCAAGAA GCGCAATGAC CACTTCGGCC ACTATGTGTG CCAGCCAGAT 360

GGCAACTTGT CCTGCCTGCC CGGTTGGACT GGGGAATATT GCCAACAGCC TA 412

配列番号　：１５

配列の長さ：２８

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

CGGCGACGCC CGAGGGGATG GCGGCAGC 28

配列番号　：１６

配列の長さ：３０

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

GAATTCCACC GCGGTGGAGC TCCAATTCGC 30

配列番号　：１７

配列の長さ：２８

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

TCAGCTGGGC GGCAAGCCCA CGGGGAAC 28

配列番号　：１８

配列の長さ：３３

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

GCGGCCGCTT ATCGATACCG TCGACCTCGA GGG 33

配列番号１９

配列の長さ：５２

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

TCATTTATCA TCATCATCTT TATAATCGCT GGGCGGCAAG CCCACGGGGA AC 52

配列番号　：２０

配列の長さ：３６

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

AAAGGATCCG AGGGCGGCAA GCCCACGGGG AACTCG 36

配列番号　：２１

配列の長さ：２５

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

TTATACCTCC GTGGCAATGA CACAT 25

配列番号　：２２

配列の長さ：５２

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

TCATTTATCA TCATCATCTT TATAATCTAC CTCCGTGGCA ATGACACATT CA 52

配列番号　：２３

配列の長さ：３６

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

AAGGATCCCG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCA　　　　36

配列番号　：２４

配列の長さ：３３

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（化学合成ＤＮＡ）

配列

CCTCTAGAGT CGCGGCCGTC GCACTCATTT ACC　　　　33

【図面の簡単な説明】

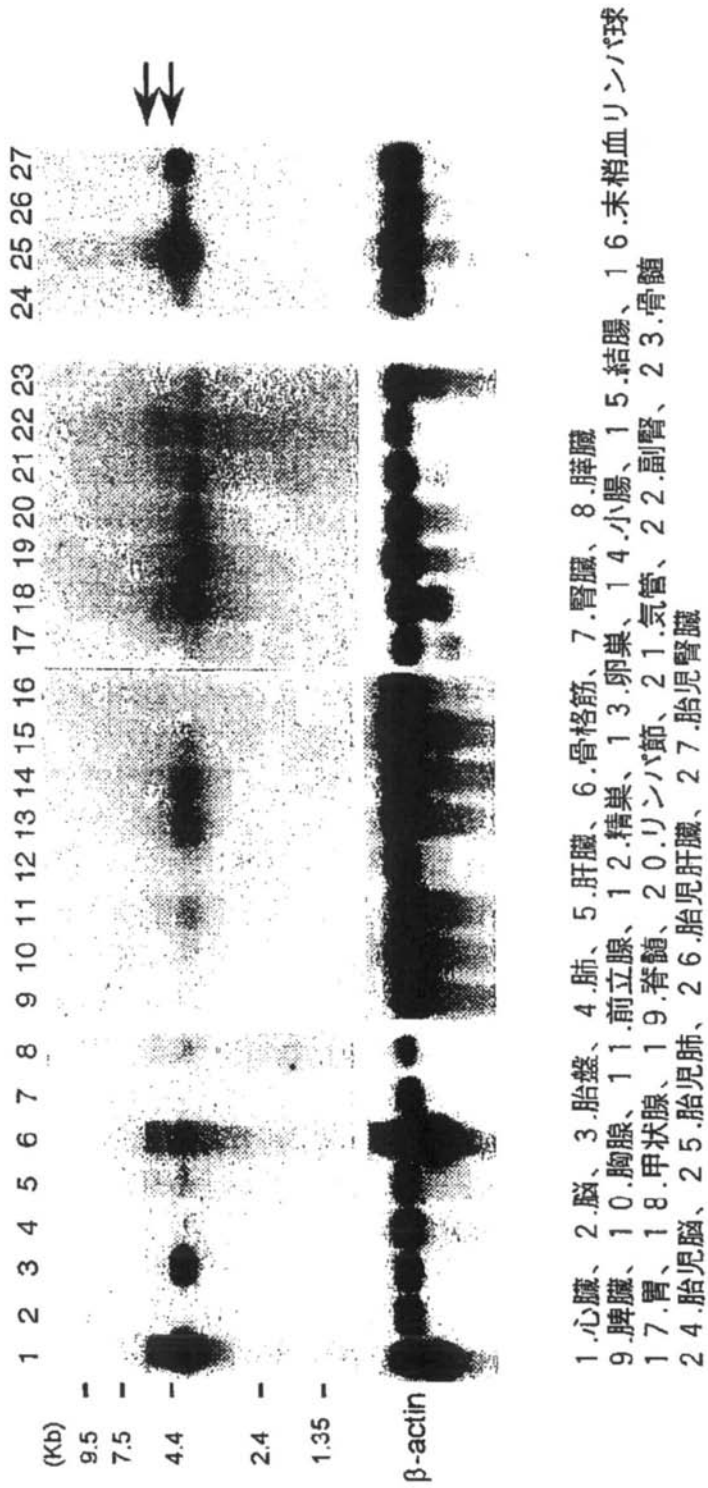
【０１４７】

【図１】第１図はヒト各種臓器におけるヒトデルター２ｍＲＮＡの発現を調べたノザンブロットの図である。

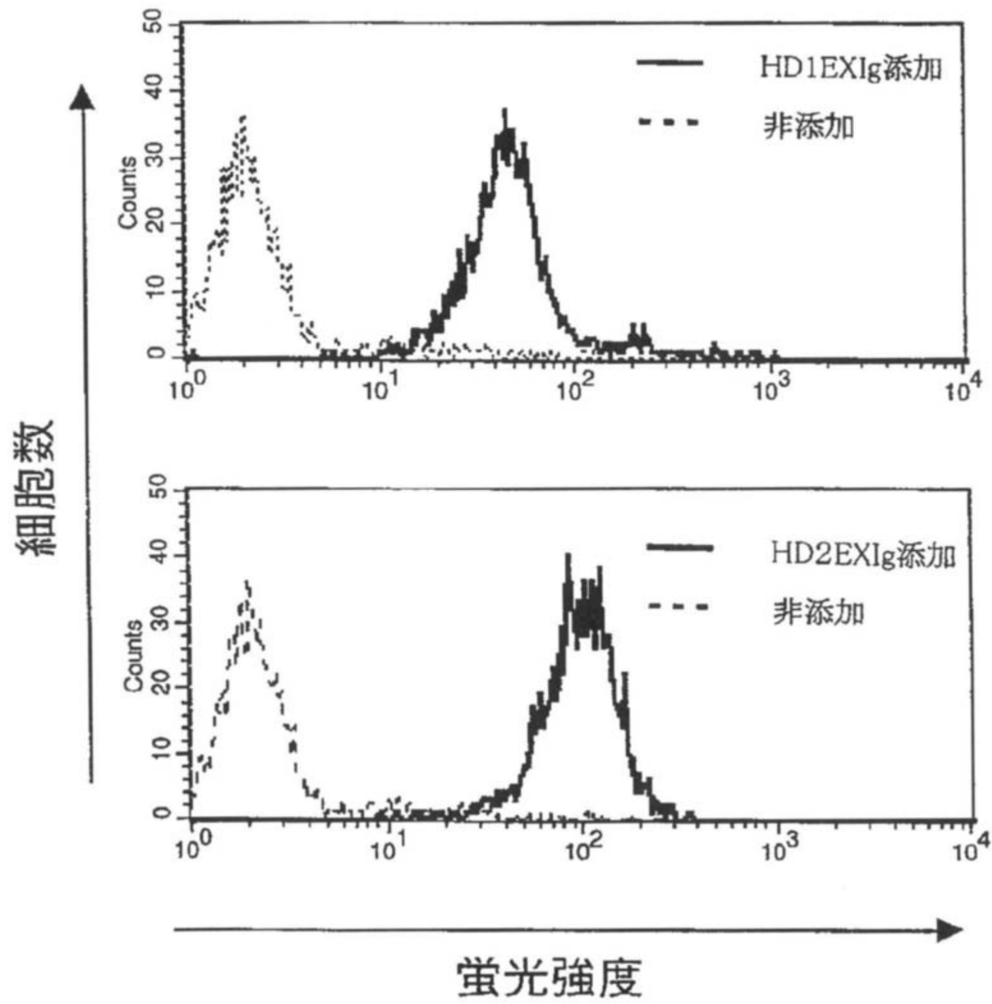
【図２】第２図はヒト由来Ｔ細胞系細胞株Ｊｕｒｋａｔに対する本発明のＨＤ２ＥＸＩＧと比較のＨＤ１ＥＸＩＧの結合を示すものである。

【図３】第３図はヒト臍帯血単核球ＣＤ３４陽性細胞に対する本発明のＨＤ２ＥＸＩＧと比較のＨＤ１ＥＸＩＧの結合を示すものである。

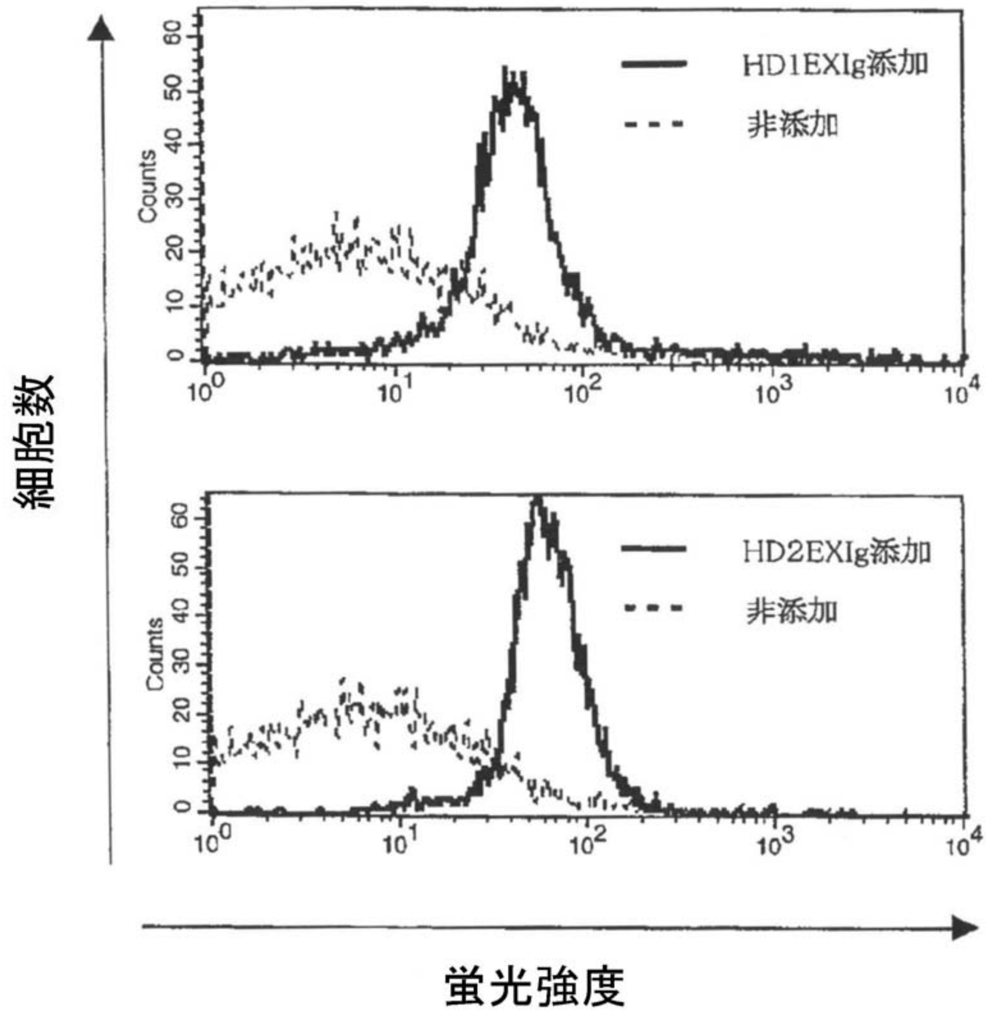
【図１】


1 2 3 4 5 6 7 8
9 10 11 12 13 14 15 16
17 18 19 20 21 22 23
24 25 26 27
(Kb)
9.5
7.5
4.4
2.4
1.35
β-actin
１.心臓、２.脳、３.胎盤、４.肺、５.肝臓、６.骨格筋、７.腎臓、８.膵臓
９.脾臓、１０.胸腺、１１.前立腺、１２.精巣、１３.卵巣、１４.小腸、１５.結腸、１６.末梢血リンパ球
１７.胃、１８.甲状腺、１９.脊髄、２０.リンパ節、２１.気管、２２.副腎、２３.骨髄
２４.胎児脳、２５.胎児肺、２６.胎児肝臓、２７.胎児腎臓

【図２】



【図３】



【配列表】
2008260773000001.app